



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

MELYNA MARQUES DE ALMEIDA

**Estudo experimental de Implantes com superfície ativada
pela tetraciclina. Caracterização topográfica, histométrica,
histoquímica e imunohistoquímica**

MELYNA MARQUES DE ALMEIDA

Estudo experimental de Implantes com superfície ativada pela tetraciclina. Caracterização topográfica, histométrica, histoquímica e imunohistoquímica

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Odontologia – Área de Implantodontia.

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

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

Almeida, Melyna Marques de.
A447e Estudo experimental de Implantes com superfície ativada pela tetraciclina. Caracterização topográfica, histométrica, histoquímica e imunohistoquímica./ Melyna Marques de Almeida. –
Araçatuba, 2021
57f.: il.; tab.

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

1. Implantes dentários. 2. Tetraciclina. 3. Osseointegração.
I. T.

Black D7
CDD 617.64

À Deus,

Que com sua infinita sabedoria foi um verdadeiro guia nesta jornada, colocando no meu caminho pessoas incríveis que me encheram de amor e estímulos para concretização deste grande sonho.

AGRADECIMENTOS

Quem me apoiou, ajudou e fez chegar até aqui, eu agradeço de coração.

Agradeço a Deus por esta oportunidade.

A nossa senhora Aparecida, minha inesgotável fonte de fé.

Em especial, ao meu orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Você exerce como ninguém a arte de ensinar. Suas palavras de estímulo, atenção e disponibilidade foram indispensáveis para a realização desse e outros sonhos. Não hesito em afirmar que você foi o maior incentivador e referência que tive durante a vida acadêmica. É um orgulho enorme ter sido sua aluna. Serei eternamente grata!

Aos meus pais Pedro e Sônia que me educaram com amor e me incentivaram nunca desistir dos meus sonhos, fizeram de mim a pessoa que hoje sou e só tenho motivos a agradecer.

Ao meu avô Victorio por ser fonte de inspiração e determinação. Se cheguei até aqui foi porque seus estímulos quando pequenina me fez germinar e crescer e assim desenvolver esta flor.

Aos meus irmãos Anderson, Daniele e Dahiani e meus sobrinhos Anna, Lucas, Luigi e Maria Clara por me estimular a ser uma pessoa melhor e alegrar meus dias.

Ao meu noivo Luiz que com seu amor e companheirismo esteve presente em todos os momentos me estimulando, dando apoio. Sua forma de ver a vida com leveza e paciência me ensinaram muito durante todos esses anos de convivência. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos de pós-graduação Bruna, Thiago, Luiza, Marina Fuzette, Marina Cury, Caio, Renan e Juceléia e alunos de graduação Yasmin, Isabella, Victor Hugo que tornaram os meus dias mais leves e a caminhada mais alegre. Obrigada por todo apoio neste trabalho, pelos dias longos de pesquisa, pelas risadas e compartilhar da vida.

Ao professor Francisley pelos momentos de aprendizagem, competência, pela sua ajuda e disponibilidade sempre que precisei. Serei eternamente grata, muito obrigada!

A professora Roberta sua presença constante, ensinamentos e otimismo foram essenciais para essa trajetória, tornando tudo mais simples. Obrigada!

Agradeço ao professor André Luis Fabris sempre solicito ajudar e esclarecer minhas dúvidas, com muita leveza e dedicação.

Agradeço ao Professor Albanir Gabriel Borrasca por todo o cuidado e dedicação em meu aprendizado.

A Professora Mariza que com sua dedicação e profissionalismo me incentivou a seguir em frente e buscar soluções simples e eficazes. Fazendo toda diferença. Gratidão!

A professora Daniela Brandini pela acolhida de irmã mais velha, pelos conselhos e ensinamentos que fizeram a diferença ao longo desta trajetória.

Prof. Casatti, a quem tanto admiro, obrigada por estar sempre presente e sua enorme paciência para atender minhas múltiplas questões.

Dirce Maria, minha amiga e mãe de Araçatuba, agradeço os conselhos, o colo, por dividir a sua família e me acolher nos dias de luta e de alegrias.

Fran, Camila e Dai, secretárias do prof. Idelmo, por todo acolhimento durante toda a minha jornada e não pouparam esforços para me ajudar. Gratidão!

Unesp Campus de Ilha Solteira e Unesp Campus de Araraquara por ter me ajudado nas análises de MEV/EDS e Rugosidade que tanto contribuíram para o meu trabalho.

Implalife pela doação dos implantes estudados neste trabalho, sempre receptiva a solucionar minhas dúvidas e prestativa em ajudar.

Agradeço ao departamento de Cirurgia, Periodontia e Clínica Integrada, professores e a todos que convivem nele, pelo acolhimento desde o início de minha jornada. Agradeço em especial ao prédio 5 e laboratório “Tetuo OKamoto”, ao chefe de departamento prof. Francisley Ávila de Sousa, secretário Renato e seus técnicos Marco Yaner e Paulo Gratão e técnicos aposentados Maria Dirce Coli e Gilmar, pela

permissão e todo o suporte para realizar este trabalho, incentivos e dedicação a pesquisa para que fosse possível viver este momento. Existe muito a agradecer, muitas pessoas, momentos que estarão sempre na memória e com toda certeza contribuíram para o meu crescimento! A este lugar, que nestes 8 anos foi minha segunda casa em que a amizade fez os meus dias mais leves e auxiliaram no meu desenvolvimento. Agradeço por todo o aprendizado que tive, pelos incentivos constantes e dedicação a minha formação, que tenho orgulho de dizer que a minha base tanto cirúrgica quanto da implantodontia vem deste berço e deste departamento. Gratidão!

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, e vice-diretor, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

Agradeço a Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do seu coordenador Prof. Dr. André Brizo e supervisoras técnicas de sessão de pós-graduação: Valéria Queiroz Zagato, Cristiane Regina Lui Matose Lilian Sayuri Mada Pinheiro, pelo impecável trabalho que desenvolvem visando o crescimento do programa.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que sem dúvida nenhuma foram essenciais à manutenção durante o primeiro ano de curso.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar possibilidades para a produção ou sua construção. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender”

Paulo Freire

Almeida MM. Estudo experimental de Implantes com superfície ativada pela tetraciclina. Caracterização topográfica, histométrica, histoquímica e imunohistoquímica [tese] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP; 2021.

RESUMO

Modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade, favorecer as respostas biológicas em um período de reparo mais curto e, conseqüentemente, favorecer o sucesso a longo prazo dos implantes osseointegráveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar experimentalmente a modificação de superfície de implantes dentários pela adição de tetraciclina com avaliações pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Energia Dispersiva de Raios X (EDS), medidas do ângulo de contato e processo de reparo peri-implantar pelo método imunohistomorfométrico. Foram utilizados quarenta e oito implantes (1,6mm de diâmetro e 4,0 mm de comprimento) e 6 discos de titânio (6mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura) divididos em dois grupos: Grupo Tratamento Ácido (GA) e Grupo Tratamento Tetraciclina (GT). Para análise topográfica utilizou seis implantes com distribuição igual entre os grupos. Para a análise de rugosidade utilizou-se os 6 discos de titânio com distribuição igual entre os grupos. Para os testes em animais foram utilizados 42 implantes e 42 ratos Wistar igualmente divididos em dois grupos com implantes instalados na tíbia e divididos em três períodos experimentais: 7,30 e 60 dias. Os espécimes foram processados para avaliação histológica e imunohistoquímica. Resultados: A topografia de superfície revelou que GA apresentava microcavidades de rugosidade homogênea, sem contaminação da superfície e com picos de titânio e oxigênio. GT apresentou superfície mais homogênea e regular quando comparado GA, também revelou picos de titânio e oxigênio predominantemente, com presença de discretos picos correspondentes aos elementos cálcio (Ca), fósforo (P), Carbono (C) e Magnésio. GA não apresentou molhamento enquanto GT apresentou um molhamento parcial. Comparando os valores das porcentagens da extensão de tecido ósseo em contato com a superfície do implante (BIC) e a área ocupada por tecido ósseo nas três primeiras roscas do implante (BAFO) apenas em 30 dias apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os resultados imunohistomorfométricos apontam

para a elevada sequência dinâmica dos processos biológicos de reparo nos primeiros 30 dias após a inserção do implante em ambos os grupos, tendendo ao equilíbrio aos 60 dias. Conclusão A superfície ativada pela tetraciclina se mostrou biocompatível, com ausência de reações inflamatórias junto ao tecido peri-implantar e uma ossificação adequada, sendo qualitativamente e quantitativamente superior ao grupo controle, sugerindo uma osseointegração precoce.

Palavras-chave: Implantes dentários. Tetraciclina. Osseointegração

Almeida MM. **Experimental study of implants with surface activated by tetracycline. Topographic, histometric, histochemical and immunohistochemical characteristics.**[tese] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP; 2021.

ABSTRACT

Topographic and physical-chemical modifications of the surface of the implants have been proposed to increase the percentage of bone-implant contact, especially in areas of lower density bone tissue, favor biological responses in a shorter repair period and, consequently, favor the long-term success of osseointegrated implants. The objective of this work was to experimentally evaluate the surface modification of dental implants by adding tetracycline with evaluations by Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Dispersive Energy (EDS), contact angle measurements and peri-implant repair process by the immunohistomorphometric method. Forty-eight implants (1.6 mm in diameter and 4.0 mm in length) and 6 titanium discs (6 mm in diameter and 1.5 mm in thickness) were used, divided into two groups: Acid Treatment Group (GA) and Group Tetracycline treatment (GT). For topographic analysis, six implants were used with equal distribution between groups. For the roughness analysis, the 6 titanium discs were used with equal distribution between the groups. For the animal tests, 42 implants and 42 Wistar rats were equally divided into two groups with implants installed in the tibia and divided into three experimental periods: 7, 30 and 60 days. The specimens were processed for histological and immunohistochemical evaluation. Results: The surface topography revealed that GA had homogeneous roughness microcavities, without surface contamination and with titanium and oxygen peaks. GT showed a more homogeneous and regular surface when compared to GA, it also revealed titanium and oxygen peaks predominantly, with the presence of discrete peaks corresponding to the elements calcium (Ca), phosphorus (P), carbon (C) and magnesium. GA showed no wetting while GT showed partial wetting. Comparing the values of the percentages of bone tissue extension in contact with the implant surface (BIC) and the area occupied by bone tissue in the first three implant threads (BAFO) in only 30 days, there was a statistically significant difference ($p < 0.05$). The immunohistomorphometric results point to the high dynamic sequence of biological repair processes in the first 30 days after insertion of the implant in both groups, tending to balance at 60 days.

Conclusion The surface activated by tetracycline proved to be biocompatible, with no inflammatory reactions close to the peri-implant tissue and adequate ossification, being qualitatively and quantitatively superior to the control group, suggesting early osseointegration.

Keywords: Dental implants. Tetracycline. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Etapas do processo de modificação de superfície.....	20
FIGURA 2 - Fluxograma do delineamento experimental	21
FIGURA 3 - Imagens representativas dos terços médios dos implantes de superfície modificada por subtração ácida nas magnificações de 500X (A), 1000X (B) e 5000x (C) em MEV. e resultados EDS (D)	27
FIGURA 4 - Imagens representativas dos terços médios dos implantes de superfície modificada por tetraciclina hidrocloreada nas magnificações de 500X (A), 1000X (B) e 5000x (C) em MEV. e resultados EDS (D)	28
FIGURA 5 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x).....	29
FIGURA 6 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E e F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x).....	30
FIGURA 7 - Fotomicrografias de comparação do período de 60 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E e F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x).....	31
FIGURA 8 - BIC (%) das superfícies GA e GT, nos períodos de 7, 30, e 60 dias	32
FIGURA 9 - BAFO (%) das superfícies GA e GT, nos períodos de 7, 30, e 60 dias	33
FIGURA 10 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)	33
FIGURA 11 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)	34
FIGURA 12 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)	35

FIGURA 13 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x)	37
FIGURA 14 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x).....	38
FIGURA 15 - Fotomicrografias de comparação do período de 60 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x).....	39
FIGURA 16 - Pontuações representativas (mais frequentemente observadas) da imunomarcacão, categorizadas em leve / discreta (+), moderada (++) , intensa (+++) ou ausente (-), de acordo com a área / quantidade de células positivas para cada antígeno em todos os grupos em ambos os períodos.....	40

LISTA DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
BAFO	Área ocupada por tecido ósseo nas três primeiras roscas do implante
BIC	Extensão de tecido ósseo em contato com a superfície do implante
BMP	Proteínas ósseas morfogenéticas
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GA	Grupo Tratamento Ácido
GT	Grupo Tratamento Tetraciclina
H ₂ O ₂	Água oxigenada
HE	Hematoxilina e Eosina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina (OPG),
OPN	Osteopontina
RANKL	Ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante
RNA-m	RNA mensageiro
RNA-t	RNA transportador
SBF	Solução de fluido corpóreo
TA	Superfície modificada por tratamento ácido
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TH	Tetraciclina hidrocloreada
Ti	Titânio
TRAP	Fosfatase ácido tartaratoresistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1 Objetivos.....	18
2 MATERIAL E MÉTODO	19
2.1 Preparação da superfície teste	19
2.2 Caracterização de superfície	20
2.3 Cálculo do tamanho da amostra	20
2.4 Procedimento cirúrgico	21
2.5 Cirurgia de instalação de Implante	22
2.6 Preparação de amostra e procedimentos histológicos e histomorfométricos ..	23
2.7 Análise histológica	24
2.8 Análise histométrica.....	24
2.9 Análise histoquímica.....	25
2.10 Análise imuno-histoquímica	25
2.11 Estatísticas	26
3 RESULTADOS	27
3.1 Caracterização da topografia de superfície	27
3.2 Análise histológica	28
3.2.1 Coloração Hematoxilina e Eosina	28
3.2.1.1 – 7 dias	28
3.2.1.2 – 30 dias	30
3.2.1.3 – 60 dias	31
3.3 Análise histomorfométrica.....	32
3.4 Análise histoquímica.....	33
3.4.1 – 7 dias.....	33
3.4.2 – 30 dias.....	34
3.4.3 – 60 dias.....	35

3.5 Análise imunohistoquímica	36
3.5.1 – 7 dias.....	36
3.5.2 – 30 dias.....	38
3.5.3 – 60 dias.....	39
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	56
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	56
ANEXO B – FOTOS PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	57

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A osseointegração consiste na ancoragem óssea do implante dentário suficiente para suportar cargas funcionais (BRÄNEMARK *et al.*, 1969; PLECKO *et al.*, 2012), sendo resultado do processo de reparo ao redor dos implantes dentários. O contato inicial do implante acontece com o tecido hematopoiético, onde há formação de coágulo ao seu redor (PALMQUIST *et al.*, 2010). As células sanguíneas e suas proteínas interagem com as moléculas da superfície de titânio e guiam osteogênese (DAVIES, 1998; ZHAO *et al.*, 2005). Para o sucesso desta união, fatores como as propriedades do material do implante, forma e características da superfície, técnica cirúrgica e carga mecânica são determinantes (ADELL *et al.*, 1981).

A superfície de implantes proposta por Bränemark (1965) possuía superfície de titânio comercialmente puro e com superfície usinada, considerado por muito tempo como padrão ouro. A técnica era utilizada para reabilitar pacientes totalmente edêntulos em que se instalavam implantes unidos para distribuir as cargas oclusais em regiões anteriores de maxila ou mandíbula. Com o sucesso das reabilitações ocorreu uma extrapolação da técnica em que os implantes eram instalados em regiões de piores qualidades ósseas reabilitando com prótese sob implantes unitárias, o que piorou o prognóstico do tratamento, fato que estimulou a pesquisa sobre a modificação da superfície de implantes (BRANEMARK, 1965; PALMQUIST *et al.*, 2010).

Desde então inúmeras modificações têm sido feitas nas superfícies dos implantes, dependendo do tratamento dado, características morfológicas, físico-químicas e bioquímicas podem ser alteradas (VALVERDE *et al.*, 2013; ZAREIDOOST *et al.*, 2012), sendo que a intenção é aumentar a área de osseointegração e, conseqüentemente, permitir que estes implantes possam ser submetidos à carga protética após um tempo de reparo menor, quando comparados aos implantes de superfície usinada (KLOKKEVOLD *et al.*, 2001; TRISI *et al.*, 2002; WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009), o que melhora o prognóstico quando instalado em osso pouco compacto ou regenerado (ZAREIDOOST *et al.*, 2012).

Dentre as tais modificações, destacam-se as realizadas por técnicas de subtração, adição ou a combinação delas (TRISI *et al.*, 2002; WENNERBERG;

ALBREKTSSON, 2009). A técnica de subtração confere à superfície do implante uma topografia mais rugosa, além de alterações físicas que favorecem a retenção do coágulo sanguíneo, aumentam a resistência ao torque de remoção dos implantes (BRAGA *et al.*, 2007; TRISI *et al.*, 2002). Enquanto na técnica de adição é inserido sobre o implante usinado um produto reativo a superfície óssea, ocorrendo ação química. A intenção é aumentar o contato entre implante e células sanguíneas e induzir a osteogênese, potencializando a osseointegração (GOTFREDSEN; BERGLUNDH; LINDHE, 2001; LIN *et al.*, 2009).

A técnica de subtração por tornar a superfície do implante mais rugosa aumenta conseqüentemente a área de contato e a área de osseointegração (BUSER *et al.*, 1991). A microtopografia superficial do implante determina diretamente a tensão superficial que este irá possuir. Quanto maior a tensão superficial, maior a molhabilidade da superfície do implante, maior área de contato e maior a osseointegração (ORSINI *et al.*, 2012).

O tratamento de superfície com ataque ácido é uma técnica de subtração em que além de alterar a microtopografia superficial do implante também elimina a contaminação e a torna mais hidrofílica. O aumento da hidrofilia da superfície do implante melhora a adsorção de proteínas, o que parece favorecer a osseointegração atuando na retenção inicial do coágulo e posterior adesão de células à superfície do implante (TRISI *et al.*, 2002, ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004). Entretanto, a topografia rugosa e porosa pode proporcionar adesão de biofilme bacteriano quando exposta ao meio bucal ocasionando a periimplantite (TEUGHELIS *et al.*, 2006).

O titânio apresenta excelentes propriedades físicas, alta resistência a corrosão, baixo módulo de elasticidade e fadiga, além de biocompatível devido a formação da camada de dióxido de titânio, contudo é incapaz de estimular aposição óssea sendo considerado bioinerte (KATO *et al.*, 2000). Assim a técnica de adição se torna útil, uma vez que ocorre incorporação um agente bioativo responsável estimular respostas celulares osteogênicas (GOTFREDSEN; BERGLUNDH; LINDHE, 2001; LIN *et al.*, 2009).

Estudos de agentes biomiméticos é uma crescente área de pesquisa no campo da implantodontia, em que se investiga a adição de agentes bioativos na

superfície do implante para que se acelere o processo de reparo perimplantar e também diminua o tempo de tratamento. Os agentes biomiméticos são projetados para provocar respostas celulares mediadas por interações entre o agente e o tecido (SHIN; JO; MIKOS, 2003).

Com a finalidade de diminuir as chances de infecção perimplantar alterações nas superfícies de implantes podem ser feitas adicionando antibióticos com o objetivo de tornar a superfície biologicamente ativa, desta forma, prevenindo a infecção periprotética inicial (PARVIZI *et al.*, 2004). A palavra antibiótico deriva do grego e significa “contra vida”. Os antibióticos são substâncias químicas específicas, derivadas de organismos vivos ou sintetizadas em laboratórios. São capazes de inibir processos vitais em outros organismos vivos, inclusive em pequenas concentrações (BRUNTON *et al.*, 2012; RANG *et al.*, 2012).

A Tetraciclina hidrocloreto (TH) pertence à classe antibiótica das Tetraciclinas, agentes bacteriostáticos de largo espectro, que agem inibindo a síntese proteica de bactérias sensíveis, bloqueando a ligação do RNA-t (RNA transportador) ao RNA-m (RNA mensageiro) do complexo ribossômico 30S desses microrganismos. Seu espectro de ação abrange microrganismos Gram-positivos (aeróbicos e anaeróbicos), Gramnegativos, protozoários, micoplasma, clamídias, riquetsias e espiroquetas (BRUNTON *et al.*, 2012; RANG *et al.*, 2012). Além de possuir propriedades anti-inflamatórias (GLABER; CREAMER 1991; WIKESJÖ *et al.*, 1986) suprimindo a quimiotaxia e migração de neutrófilos e inibindo a proliferação de linfócitos (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006). Possui também capacidade imunossupressora, de inibição de lipase e colagenase, de apoptose e angiogênese. (ROBERTS, 2003; SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006).

O uso tópico da TH na odontologia é justificado pela ação antimicrobiana e descalcificadora, que possibilita exposição proteica dos tecidos duros assim utilizada em procedimentos periodontais regenerativos, como biomodificador radicular em substituição ao ácido cítrico e EDTA (ABED *et al.*, 2013; MARIOTTI, 2003; NAGATA *et al.*, 2005). Age na descontaminação da superfície radicular em portadores de doença periodontal com objetivo de condicionamento químico: remove a smear layer, bactérias e toxinas. Em razão do baixo pH fornece desmineralização superficial do substrato, o que favorece a adesão da fibronectina. Auxiliando assim, na formação e adesão do coágulo de fibrina. Além de estimular fatores de

crescimento e adesão celular de fibroblastos na superfície dentinária, o que promove passo importante para o processo cicatricial com a formação do epitélio funcional longo (NAGATA *et al.*, 2005).

Outra função interessante da TH é que em razão do baixo pH pode atuar na desmineralização óssea artificial que é utilizada em procedimentos de enxertia óssea empregando blocos ósseos (REZENDE *et al.*, 2014) ou osso particulado e no processamento de enxertos de osso humano liofilizado desmineralizado (LIBIN; WARD; FISHMAN, 1975) que tem função de potencializar os processos reparativos em tratamentos cirúrgicos (LEWANDROWSKI *et al.*, 1999; URIST, 1965; URIST *et al.*, 1968). A importância é que agentes ácidos como o ácido cítrico, TH e EDTA atuam em tecido ósseo eliminando a fase mineral, o que antecipa a fase de remodelação, acelerando o processo de reparo. Desta forma, o conteúdo proteico é exposto sendo constituído principalmente de proteínas ósseas morfogenéticas denominadas BMP. As BMPs fazem parte da superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β) que são essenciais para formação óssea endocondral (MAIA *et al.*, 2013). E sua liberação é dependente do nível de desmineralização (PIETRZAK *et al.*, 2013).

São significativos os estudos sobre as propriedades da TH, o que pode trazer um efeito biológico benéfico se adicionados a superfície de implantes. Diante do exposto, o tratamento de superfície do implante combinando as técnicas de subtração ácida e adição de tetraciclina hidrocloreada pode trazer alguma contribuição no processo de reparo ao redor de implantes.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar experimentalmente a modificação de superfície de implantes dentários pela adição de tetraciclina com avaliações pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Energia Dispersiva de Raios X (EDS), medidas do ângulo de contato e processo de reparo periimplantar pelo método imunohistomorfométrico.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados neste estudo 46 implantes de Ti com inserção interna e superfície modificada por tratamento ácido (TA) com dimensões de 1,6 de diâmetro e 4,0 mm de comprimento- Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil, e 6 discos de titânio modificada por tratamento ácido, com dimensões de 6mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil, distribuídos igualmente em dois grupos: 1) Grupo Superfície modificada com Tetraciclina Hidroclorada (GT) e Grupo Tratamento Ácido (GA).

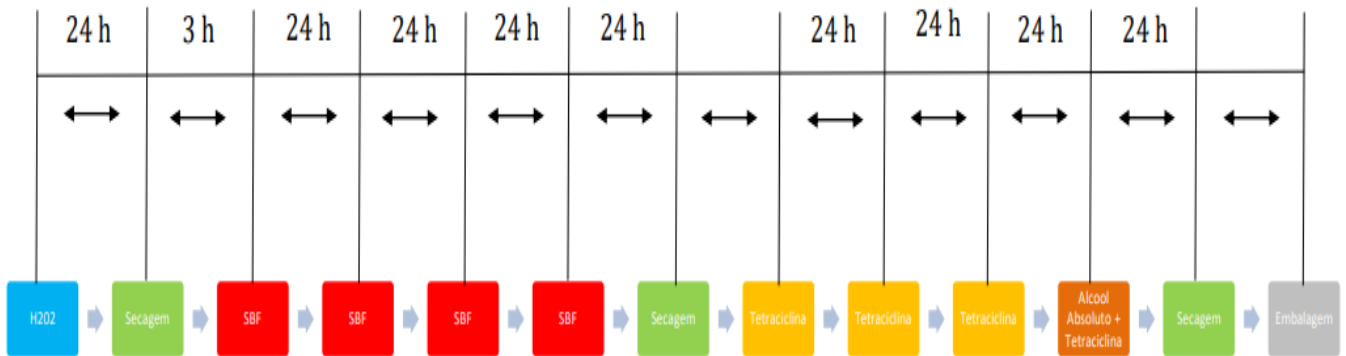
A preparação da Superfície Teste foi realizada no Laboratório de Pesquisa “Tetuo Okamoto” do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Araçatuba e a outra superfície do grupo controle possuía superfície igual a disponível comercialmente.

2.1 Preparação da superfície teste

O protocolo estabelecido (APARECIDA, 2009) usou o método similar ao biomimético.

Resumidamente, as amostras foram imersas em 50 mL de água oxigenada (H_2O_2 , 10 volumes) na estufa por um período de 24h a 60°C para ativação superficial. Em seguida, mantidas em estufa por 3h a 60 ° C para secagem da superfície. E então colocadas em 50 mL de SBF por um período de 4 dias a 37°C e pH 7,0, com solução trocada a cada 24 h para manter o equilíbrio de íons. Seguida de secagem em estufa à 37°C. E então imersas em 50 ml de solução de tetraciclina hidroclorada (0,5%) sob agitação por um período de 72 horas em estufa à 37°C, com trocas diárias da solução para manter o equilíbrio dos íons. Após este período foram colocadas em solução com proporção 1:1 de álcool absoluto mais tetraciclina (0,5%) por 24h. E secas em estufa a 60°C. Em seguida, submetidas a banho de água destilada e realizada secagem total da superfície em estufa a 60°C. Embaladas em grau cirúrgico e reencaminhadas a Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil, para serem submetidas a processo de esterilização por raios gama (Figura1).

FIGURA 1 - Etapas do processo de modificação de superfície



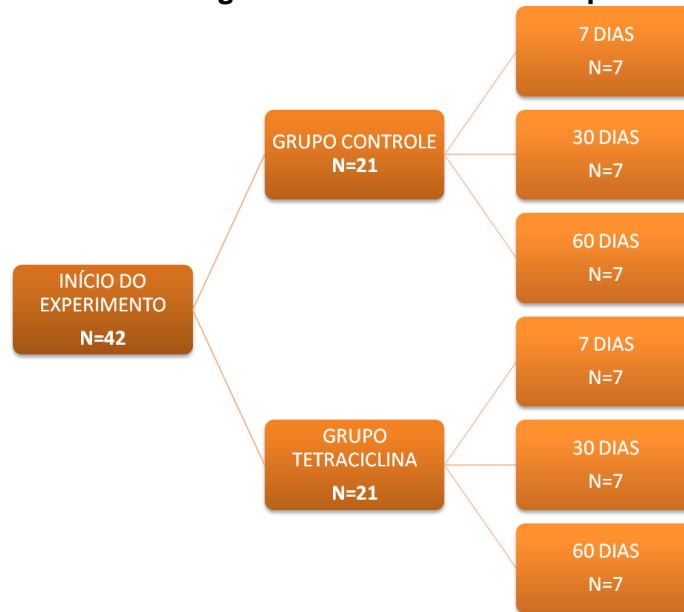
Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

2.2 Caracterização de superfície

A topografia do implante foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (ZEISS, modelo EVO LS15), acoplado a um sistema de espectroscopia de espalhamento sistema de energia dispersiva de raios-X (EDS -Oxford Instruments, modelo INCA X-act, resolução de 133 eV - 5.9KV) para análise semiquantitativa da composição química da superfície. Nesse sentido, foram utilizados dois implantes de cada grupo. Os implantes foram posicionados dentro do MEV e cinco áreas de cada amostra foram escolhidas arbitrariamente por um examinador cego. As imagens foram feitas com elétrons secundários e retroespalhados. Para a análise de EDS, a tensão de aceleração de 7 kV foi usada para melhorar a relação pico / fundo para elementos de luz.

2.3 Cálculo do tamanho da amostra

O número amostral foi determinado pelo cálculo do poder da amostra ("Power Test") por meio do website: http://www.lee.dante.br/cgi-bin/uncgi/calculo_amostra. Assim, fundamentados nos resultados publicados por PALIN *et al.* (2013) para o poder do teste a 0,8, com alfa a 5%, com a diferença da média na ordem de 20, com desvio padrão de 15.6, ficou estabelecido um número de 7 animais por grupo e tempo experimental. (Figura 2)

FIGURA 2 - Fluxograma do delineamento experimental

Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

2.4 Procedimento cirúrgico

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animal da FOA-UNESP (Processo FOA nº 00574–2017). Seguimos um desenho de modelo animal randomizado, prospectivo, controlado, seguindo todas as recomendações do Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) diretrizes para a execução e submissão de estudos em animais (KILKENNY *et al.*, 2012)

Para a realização deste estudo, foram utilizados 42 ratos (*rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso corporal em torno de 300 gramas. Aos animais serão pareados no começo do estudo para diminuir o desvio padrão. Os animais serão cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Araçatuba, onde serão mantidos em gaiolas com no máximo 4 animais cada, em ambiente climatizado e serão alimentados com ração sólida padrão e água “ad Libitum”, durante todo o experimento. Os mesmos animais foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo Tetraciclina Hidroclorada (GT): com implante de titânio com superfície modificada a base de Tetraciclina hidroclorada será instalado na tíbia direita; Grupo Tratamento Ácido (GA): com

implante de titânio com superfície modificada a base de subtração ácida será instalado na tíbia direita.

2.5 Cirurgia de instalação de Implante

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia por sedação foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina 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. Com complementação anestésica a infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na metáfise tibial.

A tíbia foi acessada após previa tricotomia da região lateral direita, feita a antissepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto). O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos. As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), uma incisão linear por planos anatômicos de 1 cm foi feita na região lateral da metáfise tibial direita. A pele e o perióstio foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição da porção lateral da metáfase tibial.

Após exposição do tecido ósseo foi realizada osteotomia bi-cortical com fresa lança (Conicidade 0-1,6mm (Diâmetro máximo de 1.6 mm) - Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil) montada em contra ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil) conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação com solução isotônica de

cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Cada animal recebeu 1 implante com travamento e estabilidade inicial,

Finalizada a instalação do implante, o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos. O plano muscular foi suturado por pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo, a sutura feita por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

Eutanásia animal

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 30 e 60 dias, sendo 7 animais por período. Realizada por dose excessiva de anestésico para a remoção das tíbias do animal com margem de 1 cm de tecido ósseo do implante dentário. As amostras de tecido (interface osso-implante) foram fixadas por 24 horas em formol (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) neutro a 10% tamponado.

2.6 Preparação de amostra e procedimentos histológicos e histomorfométricos

As amostras obtidas foram fixadas em solução de formalina a 10% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 10%, pH 7,0. Assim que a descalcificação foi verificada como concluída, os implantes foram removidos das amostras e estas processadas e incluídas em parafina; já nos blocos, foram realizados cortes semi-seriados de 5 micrômetros de espessura, corados pela hematoxilina e eosina e picrossirius red.

2.7 Análise histológica

Um único pesquisador previamente treinado para este trabalho realizou todas as análises e coleta de dados. As amostras foram avaliadas em microscopia de luz (Diastar Leica Reichert & Jung Products, Alemanha) e as imagens foram capturadas com a câmera digital acoplada (DFC - 300 - FX, Leica Microsystems, Alemanha), com aumento de 400xe analisadas em seu tamanho original. A área de tecido ósseo presente ao redor das três primeiras roscas do implante foi avaliada, sendo dividida em região cortical e medular da tíbia. Foram considerados os seguintes eventos: tecido ósseo neoformado, tecido ósseo medular neoformado, tecido conjuntivo e medula óssea da tíbia.

2.8 Análise histométrica

As mesmas imagens adquiridas para a análise histológica foram utilizadas para a análise histométrica das lâminas HE. As imagens foram armazenadas como arquivos TIFF e analisadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A área de tecido ósseo presente ao redor das três primeiras roscas do implante foi avaliada, sendo dividida em região cortical e medular da tíbia. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels e, a seguir, em porcentagens para testes estatísticos, para minimizar qualquer interferência pela diferença negativa de tamanho (MOLONet *al.*, 2013).

Para avaliar o osso próximo ao implante, duas variáveis histomorfométricas foram analisadas conforme declarado:

1 A extensão linear do implante inclui tecido ósseo em contato com a superfície do implante, entre as três roscas iniciais na região mesial e distal (BIC);

2 Área entre os fios, ocupada por tecido ósseo nas três primeiras roscas do implante na região mesial e distal (BAFO).

Os valores de BIC e BAFO de cada grupo foram comparados entre si em três períodos e para diferentes grupos em cada período avaliado.

2.9 Análise histoquímica

As análises histoquímicas em pricosirius red dos grupos experimentais foram baseadas nas disposições das fibras colágenas e na escala de tonalidades presentes nas lamelas ósseas margeando a superfície do implante, quando visualizadas em microscopia de luz polarizada.

2.10 Análise imuno-histoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada para identificar e localizar a expressão de proteínas relacionadas à remodelação óssea: Fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante (RANKL), fosfatase ácido tartaratoresistente (TRAP). As peças foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 90 dias, trocando-se a solução a cada 72 h. Assim que a descalcificação foi verificada como concluída, os implantes foram removidos das amostras. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina, fatiadas com espessura de 6 µm e colocadas em lâminas sinalizadas.

Os protocolos de imunomarcção começam com procedimentos de desparafinização e reidratação das lâminas. Segue, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena pela aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 min. A recuperação do antígeno foi realizada por tampão citrato fosfato em calor úmido. O bloqueio inespecífico da ligação foi realizado com albumina a 1% de soro bovino e leite desnatado. Posteriormente, a incubação do anticorpo primário foi realizada contra as seguintes proteínas: ALP, OPN, OCN, OPG, RANKL e TRAP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O controle negativo foi realizado através do soro do anticorpo primário do hospedeiro. O anticorpo secundário usado foi o anti-rato de burro biotilado (Jackson Immunoresearch Laboratories). A Avidina Biotina foi usada para amplificar o sinal de imunomarcção e a diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi o cromogênio.

As amostras foram contrastadas com solução de Hematoxilina Mayer para visualização dos núcleos celulares. As imagens foram obtidas por meio de câmera acoplada a microscópio de luz (Leica Reichert Diastar Prodcuts & Jung, Wetzlar,

Germany). Os níveis de expressão das proteínas na área próxima ao implante e foram avaliados por meio de uma área de extensão de marcação de proteínas: (-) sem marcação (0% das células / matriz); (+) marcação suave / discreta (<25% das células / matriz); (++) marcação moderada (25–50% das células / matriz); (+++) marcação intensa (<50 de células / matriz) Um examinador experiente realizou a análise descritiva.

2.11 Estatísticas

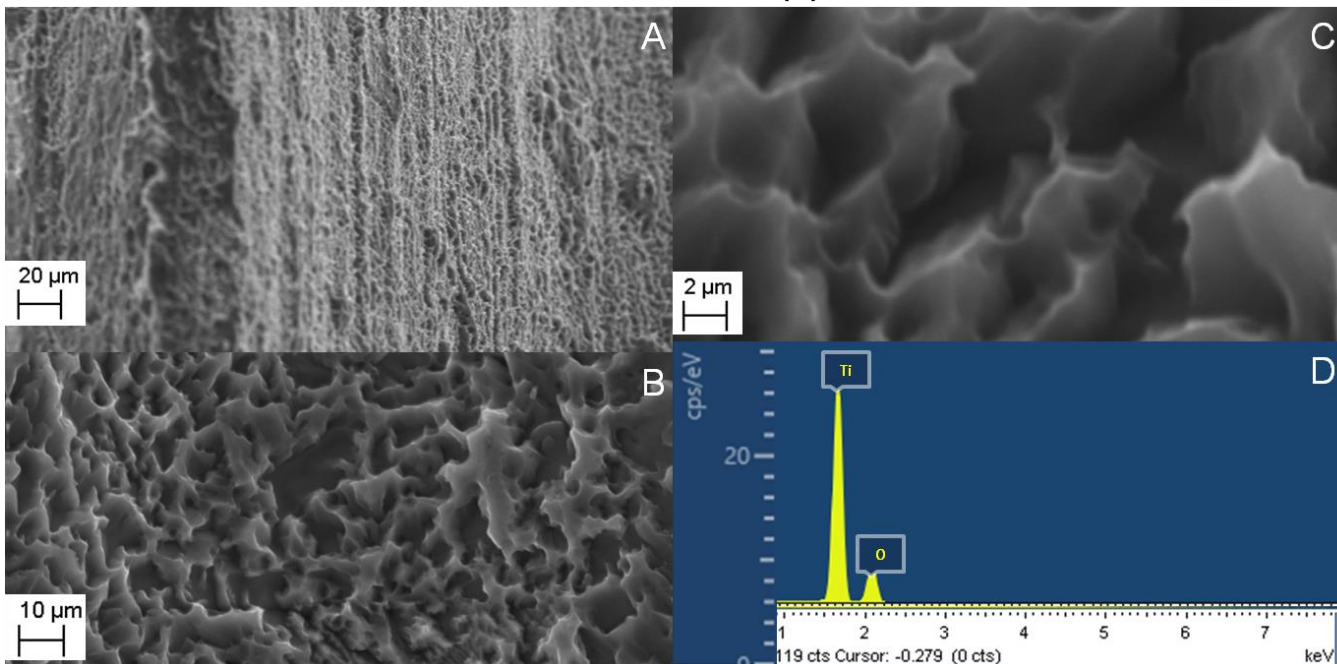
As análises foram realizadas usando GraphPad Prism Software 9.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) sendo descritiva e inferencial. Os dados são apresentados como média, mediana e desvio padrão. Diferenças estatísticas entre os GA e GT foram testadas com o teste T com correção de Welch e adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização da topografia de superfície

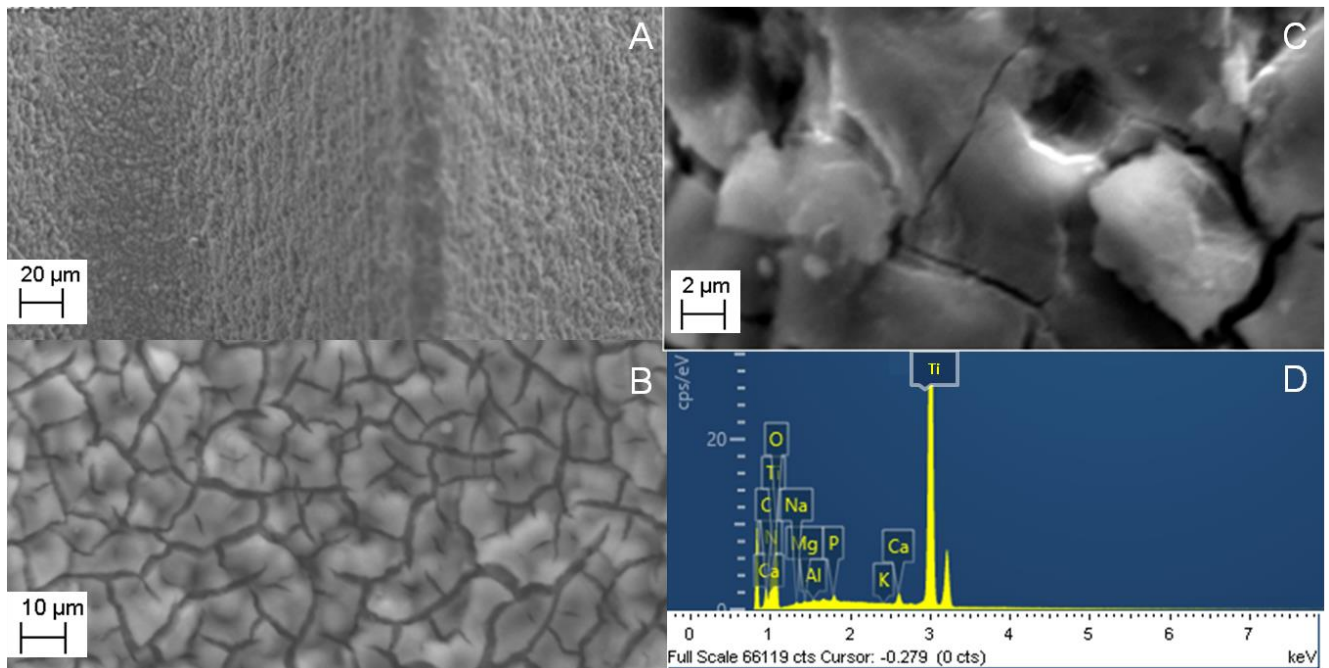
A caracterização da topografia superficial foi avaliada por MEV e EDX antes da colocação do implante na tíbia de rato. A análise de superfície mostrou diferenças topográficas entre os grupos. O GA (Figura 3A, 3B, 3C) produziu um padrão de topografia de subtração e formação de microcavidades de diferentes profundidades e tamanhos, porém, mantendo uma rugosidade homogênea. A análise por EDX (Figura 3D) não mostrou contaminação nas superfícies dos implantes e mostrou picos de titânio (Ti) e oxigênio (O). O GT (Figura 4A, 4B, 4C) produziu padrão de topografia de aposição de material, menos rugoso, regular e homogêneo quando comparado ao GA. A análise de EDS revelou picos de titânio (Ti) e oxigênio (O), diferindo de GA apenas pela presença de discretos picos correspondentes aos elementos cálcio (Ca), fósforo (P), Carbono (C) e Magnésio correspondente da superfície modificada com tetraciclina hidrocloreada (Figura 4D).

FIGURA 3 - Imagens representativas dos terços médios dos implantes de superfície modificada por subtração ácida nas magnificações de 500X (A), 1000X (B) e 5000x (C) em MEV. e resultados EDS (D)



Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

FIGURA 4 - Imagens representativas dos terços médios dos implantes de superfície modificada por tetraciclina hidrocloreada nas magnificações de 500X (A), 1000X (B) e 5000x (C) em MEV. e resultados EDS (D)



3.2 Análise histológica

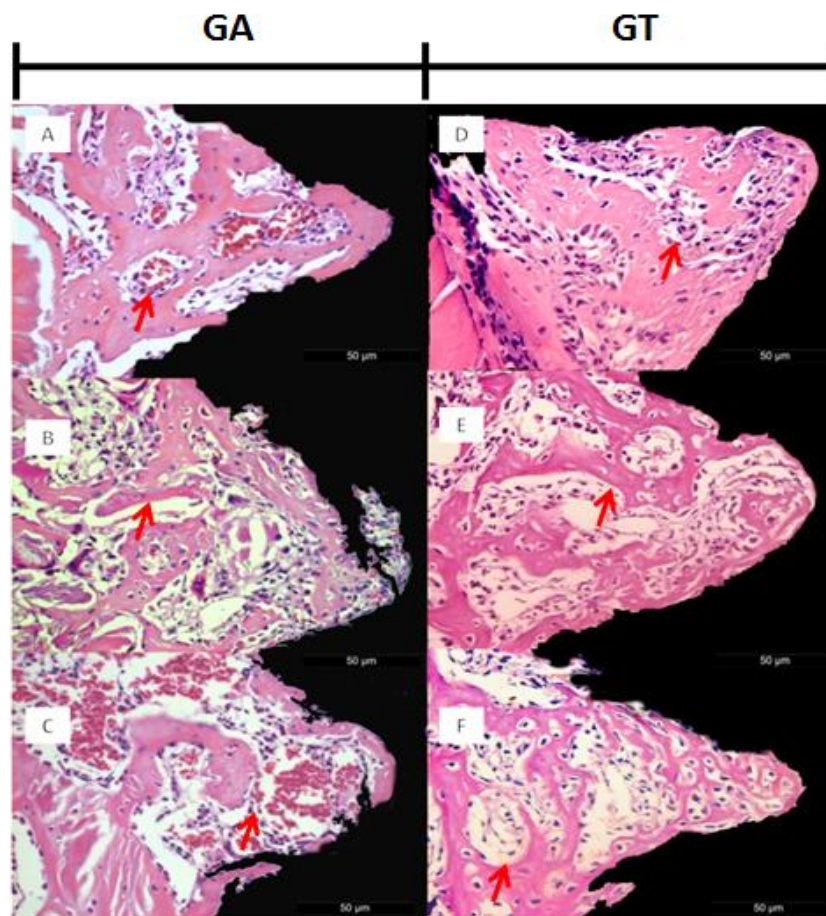
3.2.1 Coloração Hematoxilina e Eosina

3.2.1.1 – 7 dias

Nas regiões próximas a cortical da tíbia do GA observa-se a presença de formação óssea bem distribuídas com células osteoblásticas periféricas em metabolismo de deposição, apresentando trabéculas imaturas e bem irrigadas com grande quantidade de vasos (Figuras 5A e 5C setas) e ausência de infiltrados inflamatórios crônicos ou agudos. Sendo importante notar a ausência de células fibroblásticas e áreas de conjuntivo e ou fibrose. Ocorrem também áreas de desgarramento de fragmentos ósseos (Figura 5B - seta) durante o processo de fresagem. Nas regiões medulares da tíbia apresenta formação óssea bem distribuídas com trabéculas ósseas em formação, celularizadas em intensa proliferação e maturação – áreas de osteócitos e ausência de infiltrados inflamatório.

Nas regiões próximas as corticais da tíbia de GT observam-se a presença intensa de infiltrado celular (Figura 5D seta) com áreas de colagenização intensa e diferenciação osteoblásticas. Nota-se também áreas de desgarramento de fragmentos ósseos (Figura 5E seta) durante o processo de fresagem principalmente nas regiões próximas as corticais. Já nas regiões medulares ocorre um quadro de formação óssea não tão organizado com áreas de tecido conjuntivo medular bem vascularizado (Figura 5F seta) e finas trabéculas ósseas em organização. Nota-se ainda que em ambas as regiões ocorrem um padrão de ossificação acompanhando a superfície do implante com trabéculas ósseas em formação em íntimo contato com o implante mostrando um processo de osseointegração limpo sem infiltrado inflamatório e áreas de fibrose.

FIGURA 5 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x)

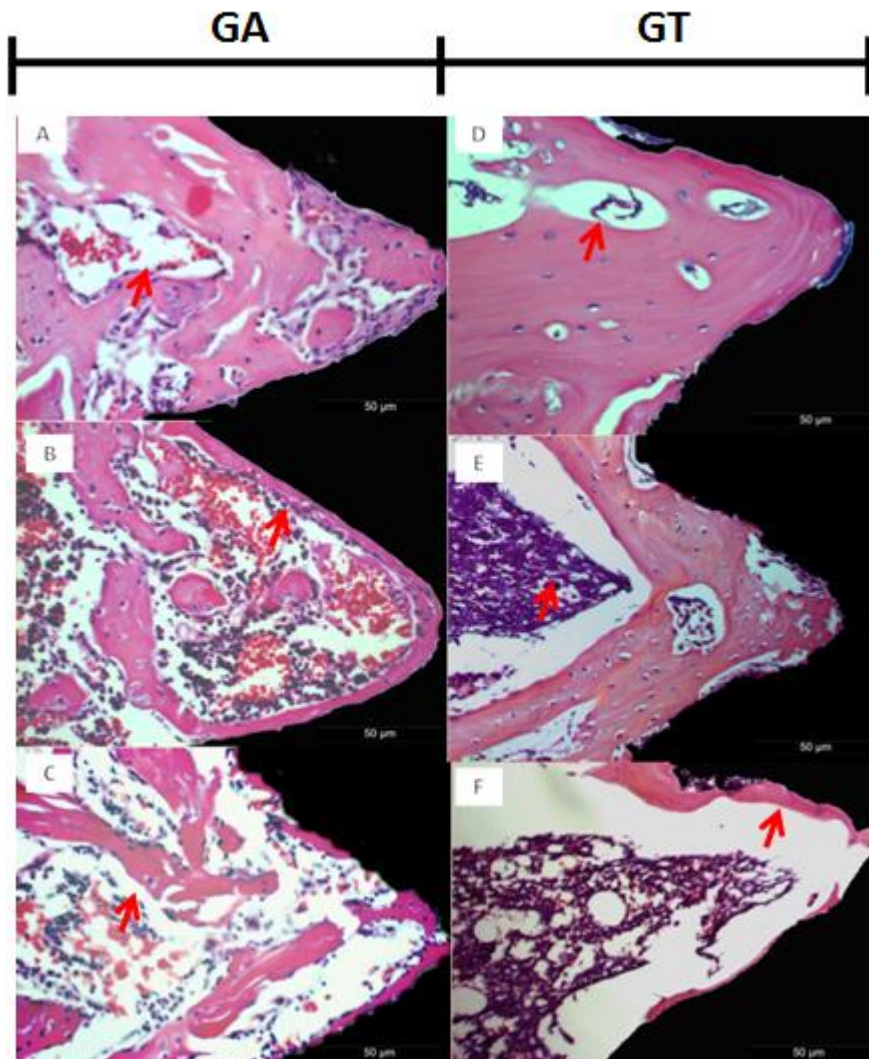


Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.2.1.2 – 30 dias

Em GA é possível perceber a presença de um processo de ossificação em nas regiões acompanhando a superfície do implante (Figura 6B seta) com de formação óssea bem distribuídas, celularizadas e em íntimo contato com o implante mostrando um processo de osseointegração limpo sem infiltrado inflamatório e áreas de fibrose no grupo controle. Já em GT apresenta em estágio de remodelação, em que se observa a corticalização junto as espiras (Figura 6F seta) e a formação medular (Figura 6E seta) inerente ao leito característico da tíbia.

FIGURA 6 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E e F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x)

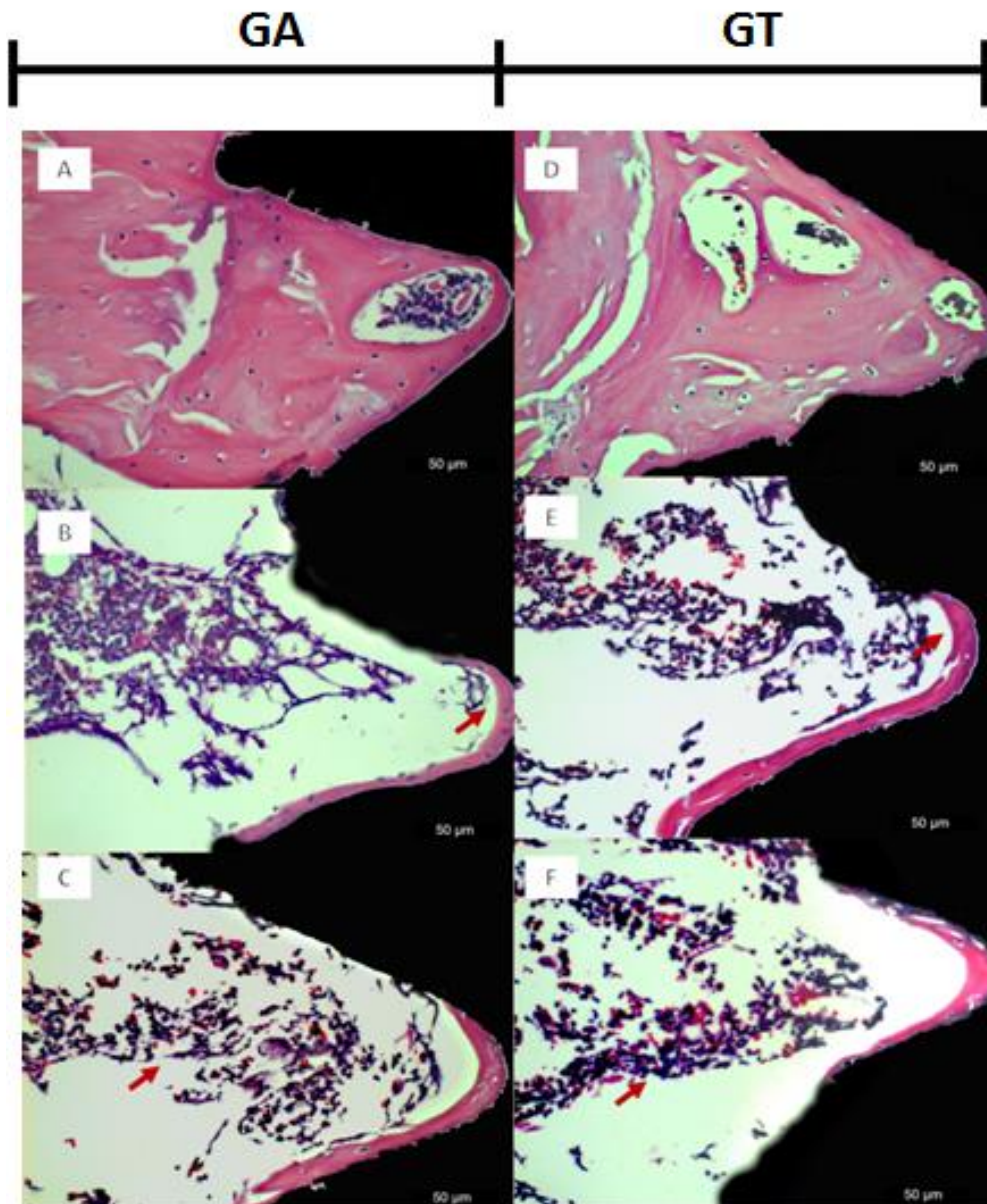


Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.2.1.3 – 60 dias

Neste período o comportamento ósseo em ambos os grupos já apresenta diferenciação final com trabéculas maduras e medula óssea íntegra (Figura 7C e 7F seta) e junto ao espaço medular e osso cortical protegendo as espiras dos implantes (Figura 7B e 7E seta).

FIGURA 7 - Fotomicrografias de comparação do período de 60 dias: GA x GT. A, B e C: Região cortical e medular do GA (Original, HE, 40x), D, E e F: Região próxima a cortical e medular do GT (Original, HE, 40x)



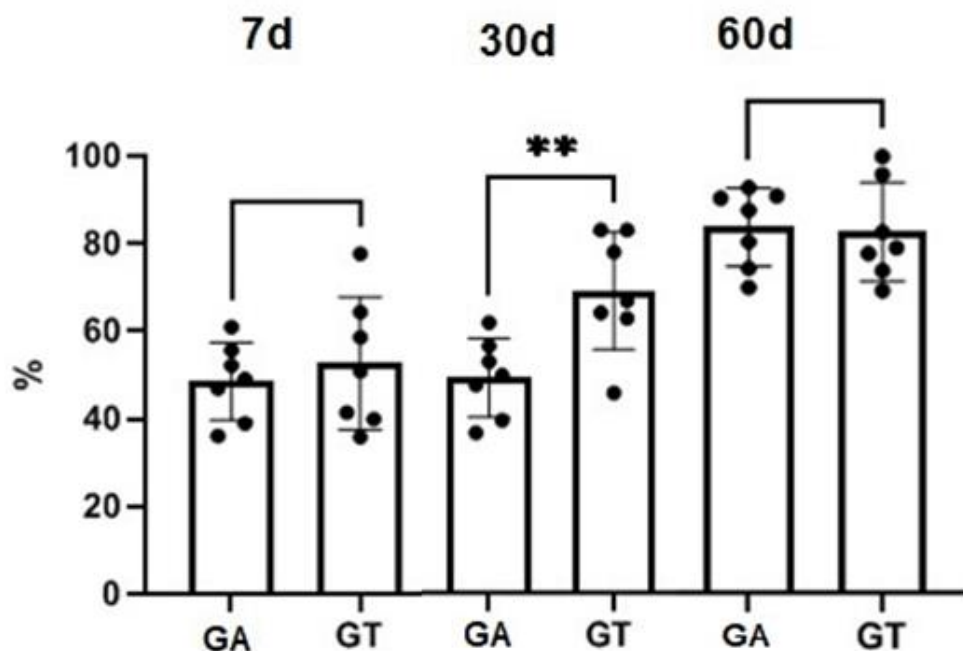
Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.3 Análise histomorfométrica

O efeito da modificação da superfície na integração do implante na tíbia de rato foi avaliado por análise histomorfométrica. BIC dos implantes GT ($68,12 \pm 3,3$), foi estatisticamente superior ($p < 0,005$) quando comparado aos implantes GA ($48,55 \pm 5,76$) no período de 30 dias. Aos 7 e 60 dias, os dois grupos não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 8).

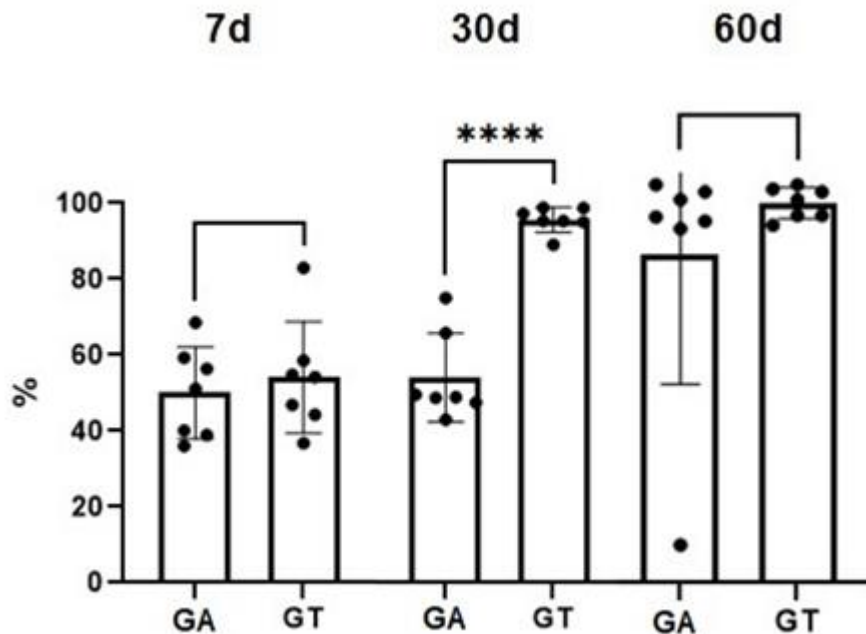
A análise BAFO do GT ($93,17 \pm 6,24$) estatisticamente superior ($p < 0,005$) ao grupo GA ($54,23 \pm 6,24$) no período de 30 dias. Aos 7 e 60 dias, os dois grupos não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 9).

FIGURA 8 - BIC (%) das superfícies GA e GT, nos períodos de 7, 30, e 60 dias



Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

FIGURA 9 - BAFO (%) das superfícies GA e GT, nos períodos de 7, 30, e 60 dias



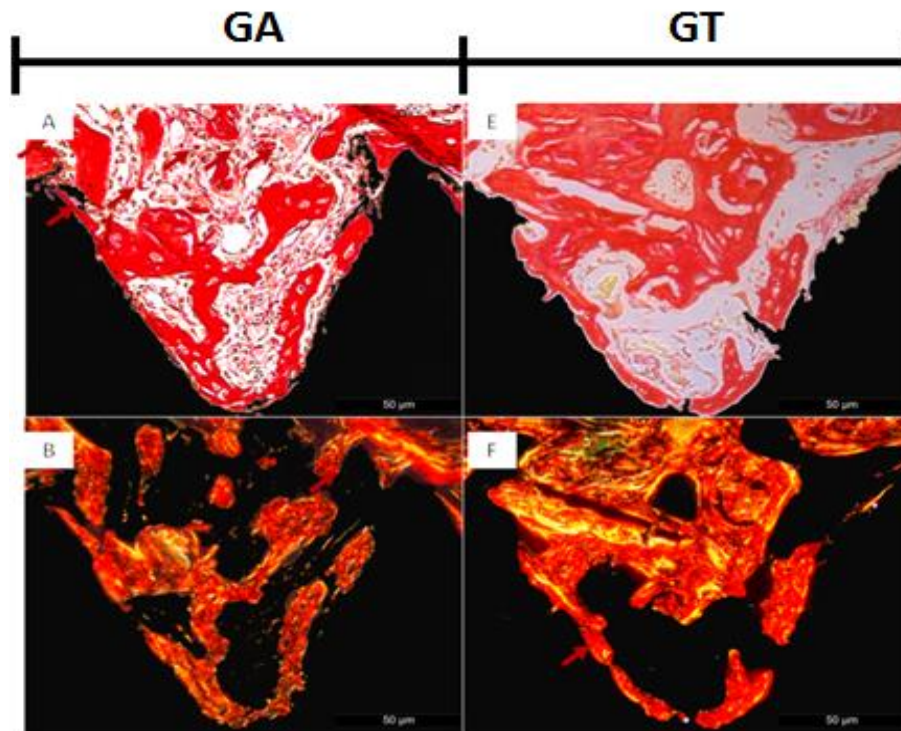
Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.4 Análise histoquímica

3.4.1 – 7 dias

Em GA fibras colágenas no tecido ósseo exibiram uma disposição de lamelas paralelas em osso trabeculado com intensa tonalidade vermelha/laranja (colágeno tipo I). Em GT apresentou-se similar ao grupo anterior o tecido ósseo, exibiu fibras colágenas de disposição paralela nas lamelas do osso trabeculado. Com relação a tonalidade, observa-se uma maior frequência de fibras colágenas com tonalidade amarela; entretanto, ainda prepondera as fibras colágenas de tonalidade vermelha/laranja (Figura 10).

FIGURA 10 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)

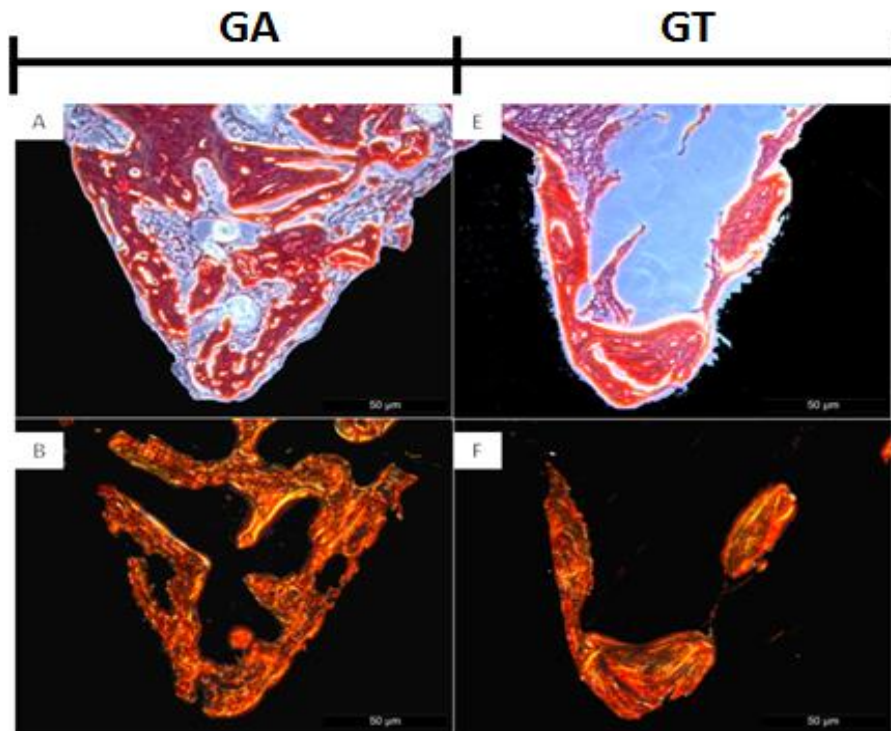


Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.4.2 – 30 dias

Em GA as fibras colágenas no tecido ósseo exibiram uma menor organização lamelar, com presença de maior frequência de fibras colágenas com tonalidade amarelas associada com aquelas de tonalidade vermelha/alaranjadas no osso superficial e aparecem algumas fibras colágenas com tonalidade verde entremeadas com as fibras colágenas amarelas e vermelhas/laranjas nas trabéculas mais distante da superfície do implante, indicando um processo de renovação do colágeno no osso. Em GT nota-se uma disposição similar com o grupo anterior (Figura 11).

FIGURA 11 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)

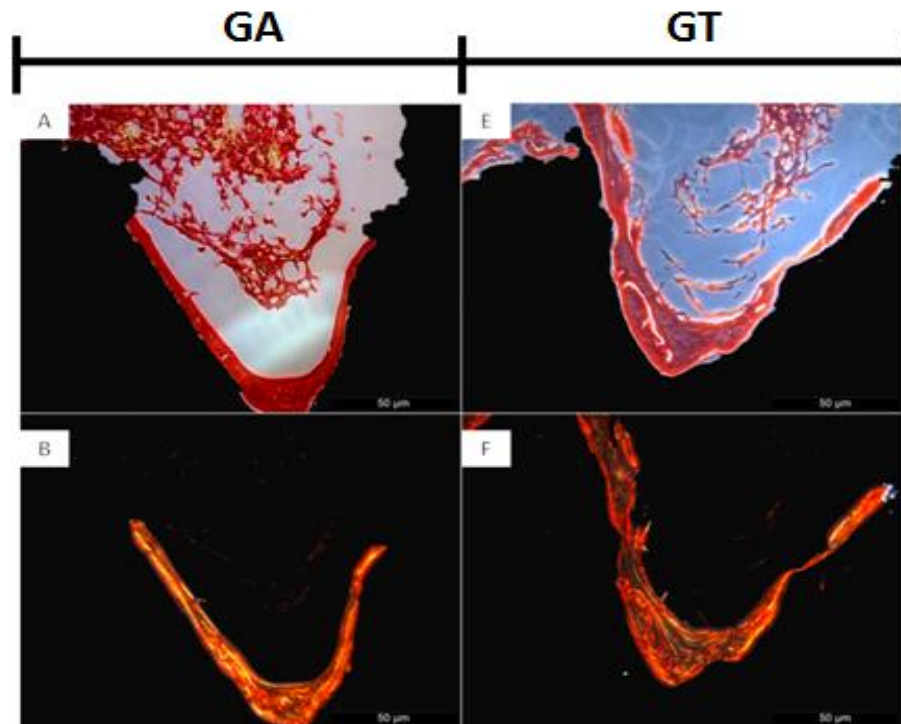


Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.4.3 – 60 dias

Em GA as fibras colágenas no tecido ósseo exibiram uma disposição de lamelas paralelas, com preponderância de fibras colágenas com tonalidades vermelha/laranja com menor frequência de fibras amarelas. Nas áreas ósseas mais distante da superfície do implante, percebe-se ainda a presença de algumas fibras colágenas com tonalidade verde. Em GT nota-se uma disposição similar com o grupo anterior (Figura 12).

FIGURA 12 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A (sem polarização), B (com polarização): Região Medular do GA (Original, HE, 40x), E (sem polarização) F (com polarização): Região medular do GT (Original, Picrosirius Red, 40x)



Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.5 Análise imunohistoquímica

3.5.1 – 7 dias

Fosfatase alcalina (ALP): Foi observado no GT uma marcação de forma moderada tanto no tecido ósseo formado como também nas células da linhagem osteoblástica. Observou-se que mesmo aos 7 dias foi possível observar o tecido ósseo formado em contato com as espiras do implante, com tecido ósseo constituído por trabéculas delgadas, no entanto, formando todo o contorno ao redor das espiras do implante e com uma importante presença da fosfatase alcalina. No GA a fosfatase alcalina mostrou-se presente de forma discreta a moderada, com células da linhagem osteoblástica marcadas positivamente para esta proteína. Observa-se o tecido ósseo formado junto às espiras do implante, porém, é um tecido ósseo numa etapa de mineralização precoce ao padrão observado no grupo tetraciclina (Figura 13).

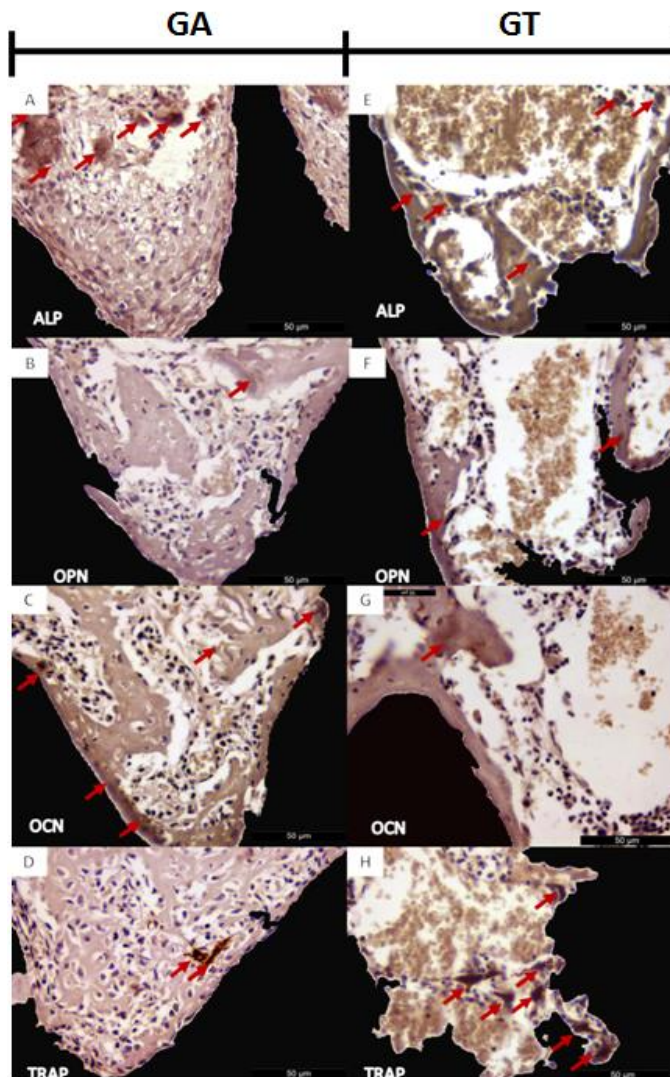
Osteopontina (OPN): Observou-se uma marcação discreta, em algumas células marcadas positivamente no GT. O mesmo padrão foi observado no GA, com discreta marcação positiva para as células osteoblásticas. Vale destacar que a

osteopontina é uma proteína que marca as linhas cementantes presentes no tecido ósseo e neste período avaliado, não foi possível observar a presença destas linhas no tecido ósseo reparacional.

Osteocalcina (OCN): Mostrou-se marcada de forma moderada para GT e pequenas precipitações desta proteína foram observadas ao longo do tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes. Já no GA, observou-se uma discreta marcação da osteocalcina, ainda presente em células, mostrando um estágio do processo de reparo cronologicamente precoce ao observado na tetraciclina, no mesmo tempo experimental.

Fosfatase ácido tartaratoresistente (TRAP): Mostrou-se moderada no grupo GT e discreta no grupo GA.

FIGURA 13 - Fotomicrografias de comparação do período de 7 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x)



Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

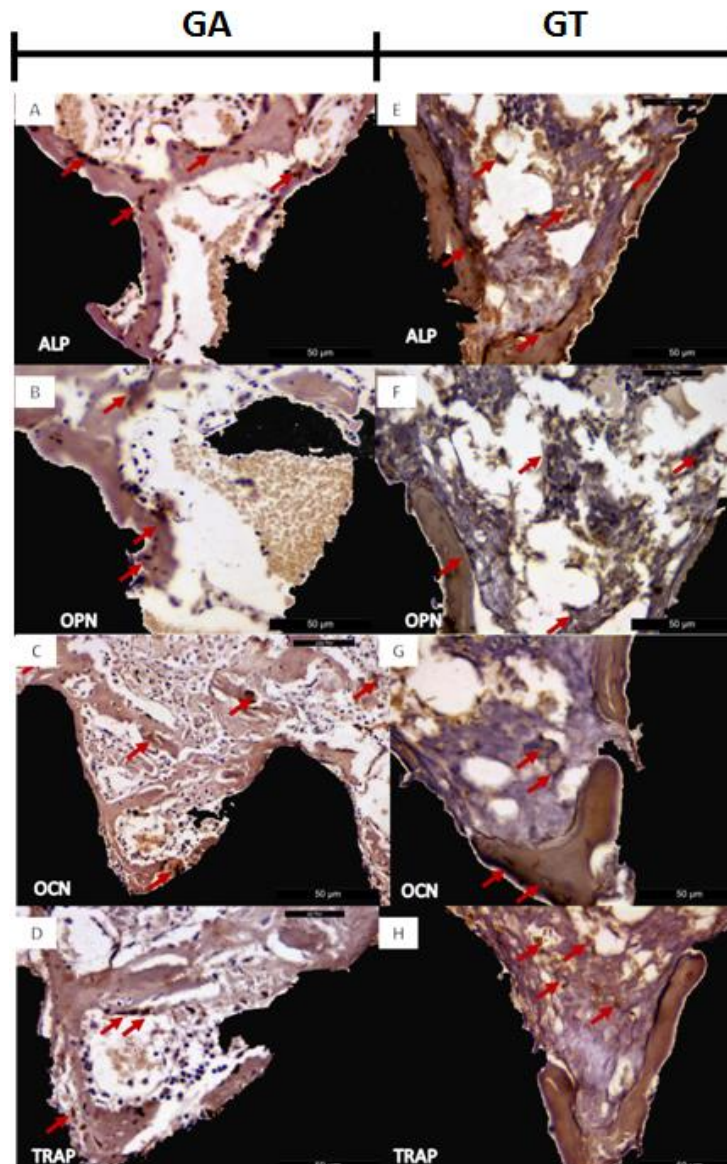
3.5.2 – 30 dias

ALP: mostrou-se presente de forma moderada a intensa, em células osteoblásticas (boné liningcells) junto ao tecido ósseo formado próximo às espiras dos implantes no GT. No GA, mostrou-se de forma moderada junto às células osteoblásticas presentes junto ao trabeculado ósseo.

OCN: mostrou-se de forma discreta no GT e moderada no GA, com uma maior presença em células osteoblásticas assim como na matriz mineralizada.

TRAP: mostrou-se discreta na GT e moderada no GA (Figura 14).

FIGURA 14 - Fotomicrografias de comparação do período de 30 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x)



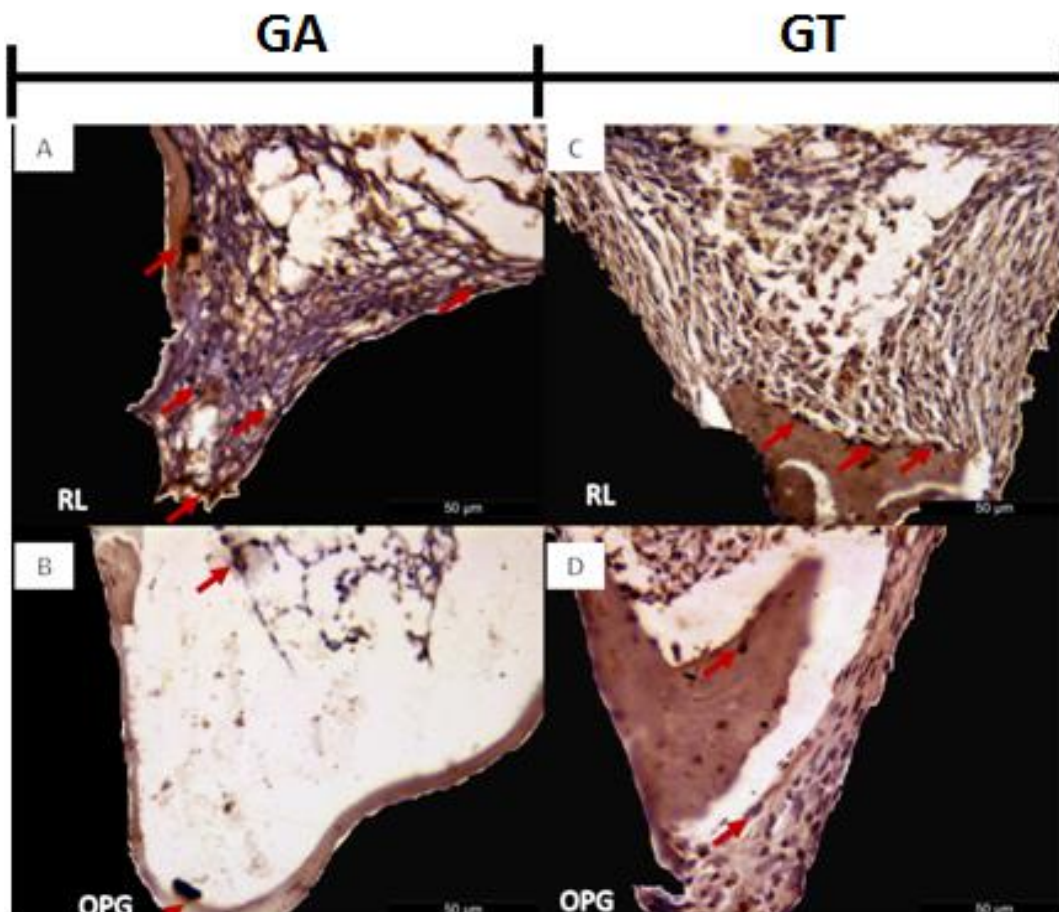
Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

3.5.3 – 60 dias

Osteoprotegerina (OPG): mostrou-se moderada no GT com a presença em células osteoblásticas junto ao tecido ósseo e na matriz óssea não mineralizada. No GA, observou-se trabécula óssea bastante delgada formada junto a espira do implante e nesta região não foi possível identificar células positivas para a OPG (Figura 15).

Ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante (RANKL): que se contrapõe à OPG mostrou-se com um padrão de marcação de discreto a moderado no GT, presente principalmente em células osteoblásticas e na matriz não mineralizada. No GA observa-se uma marcação moderada para a RANKL, presente tanto em células na matriz não mineralizada como também em células junto ao tecido ósseo formado junto à espira dos implantes (Figura 16).

FIGURA 15 - Fotomicrografias de comparação do período de 60 dias: GA x GT. A, B e C: Região medular do GA (Original, 40x), D, E e F: Região medular do GT (Original, 40x)



Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

FIGURA 16 - Pontuações representativas (mais frequentemente observadas) da imunomarcção, categorizadas em leve / discreta (+), moderada (++), intensa (+++) ou ausente (-), de acordo com a área / quantidade de células positivas para cada antígeno em todos os grupos em ambos os períodos

	ALP	OPN	OCN	OPG	RANKL	TRAP
7d						
GT	++	+	++	+		++
GA	+	+	+	+		+
30d						
GT	++		+			+
GA	++		++			++
60d						
GT				++	+	
GA				-	++	

Fonte: Elaborada pela Autora (2021)

4 DISCUSSÃO

As características superficiais dos implantes dentários como a topografia, química e rugosidade são contribuintes em melhores resultados de osseointegração, maior estabilidade do implante e encurtar o período total de tratamento (KLOKKEVOLD *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; TEUGHELIS *et al.*, 2006). O tratamento ácido (TA) das superfícies dos implantes é validado por oferecer maior superfície de contato; devido este tipo de tratamento criar microrugosidades e assim aumentar a área de contato e molhabilidade com o sítio receptor (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; STACH; KOHLES, 2003; TRISI *et al.*, 2002). Sendo uma das modificações mais utilizadas nas diferentes marcas presentes no mercado e estudadas na literatura, assim a modificação por subtração ácida é justificada como controle deste estudo (BONDARENKO *et al.*, 2020; MISTRY *et al.*, 2016; WITEK *et al.*, 2020).

A topografia influencia os estágios iniciais da osseointegração, que promove retenção do coágulo de fibrina e a adesão das células osteogênicas (KUMAR *et al.*, 2019; SHRESTHA; JOSHI, 2014). A caracterização topográfica superficial através da MEV das superfícies estudadas mostrou diferenças entre os grupos, em que o GA apresentou um padrão topográfico de subtração e formação de microcavidades de diferentes profundidades e tamanhos, porém, mantendo uma rugosidade homogênea. Essa rugosidade acontece, pois, as superfícies sofrem corrosão pelo tratamento ácido formando microporos (KUMAR *et al.*, 2019; LE GUÉHENNEC *et al.*, 2007), fato confirmado pela análise EDS em que as superfícies dos implantes apresentaram picos de titânio (Ti) e oxigênio (O), livre de contaminação.

O metal Ti forma naturalmente uma camada de óxido estável, que no passado acreditava-se que alterava sua composição induzindo resposta inflamatória que resultaria em um tecido de granulação que levaria à perda da osseointegração (WEN *et al.*, 1997). No entanto, comprovou-se que o óxido de titânio é altamente protetor da superfície do implante, o que o torna resistente à corrosão além de interagir com fluidos biológicos e tecido circundante por meio da camada de óxido (WEI; HER-HSIUNG, 2019).

Enquanto GT produziu padrão de topografia de aposição de material, menos rugoso, regular e homogêneo quando comparado ao GA. A análise de EDS revelou

picos de titânio (Ti) e oxigênio (O) em maior proporção, com presença de discretos picos correspondentes aos elementos cálcio (Ca), fósforo (P), Carbono (C) e Magnésio (Mg) correspondente da técnica biomimética modificada de aposição da TH (APARECIDA *et al.*,2009; KOKUBO *et al.*, 2006). Tais elementos encontrados condizem com elementos encontrados na matriz extracelular natural, desta forma imitando suas características, sendo benéfico para o processo de reparo perimplantar, provocando respostas celulares mediadas por interações entre o agente e o tecido (SHIN; JO; MIKOS, 2003).

Outro contribuinte para melhores resultados de osseointegração é a hidrofília da superfície, uma vez que estudos *in vitro* apresentaram aspectos favoráveis como maior diferenciação das células estromais mesenquimais em ostoblastos e indução da mineralização precoce da matriz (WALL *et al.*,2009; ZHAO *et al.*, 2005). Assim como contribui para modular a resposta inflamatória promovendo a indução da regulação negativa da expressão gênica de citocinas inflamatórias em monócitos (HAMLET *et al.*,2012). Além de possuir propriedades trombogênicas e melhorar a cicatrização óssea (HONG; KURT; THOR,2013). Outro fator a somar é o aumento da osteogênese por efeitos osteogênicos e angiogênicos na expressão gênica (DONOS *et al.*,2011).

No presente estudo, pode-se verificar que em 30 dias os resultados BIC e BAFO, apresentaram diferença estatística significativa com maiores porcentagens de BIC ($68,12 \pm 3,3$) e BAFO ($93,17 \pm 6,24$) fato que sugere osseointegração precoce do grupo GT em relação ao GA (BIC: $48,55 \pm 5,76$, BAFO: $54,23 \pm 6,24$), dados que sugerem que GT possuiu superfície mais hidrofílica. Este achado está de acordo com estudos experimentais que mostraram melhores porcentagens de BIC e BAFO em implantes com superfícies hidrofílicas (BUSER *et al.*, 2004; SARTORETTO *et al.*, 2015). Estudos indicam que quanto maior a hidrofília, maior probabilidade de adesão celular da sua superfície do implante (PALMQUIST; ENGQVIST; LAUSMAA, 2012). Fato que sugere que hidrofília tem efeito estimulante na integração do tecido duro e mole com a superfície implante, produzindo cicatrização acelerada e osseointegração precoce (GITTENS *et al.*,2014; PARK; LAKES, 2007).

Histologicamente, aos 7 dias no GT ocorreu formação óssea bem distribuída, com células osteoblásticas periféricas em metabolismo de deposição, indicando que as propriedades da superfície do implante contribuem para a regulação da

diferenciação e mineralização dos osteoblastos (MASAKI *et al.*, 2005). Fato confirmado por ALP se apresentar marcada de forma moderada tanto no tecido ósseo formado quanto nas células da linhagem osteoblástica, indicando uma intensa atividade celular (BOYAN *et al.*, 2001), além de OCN e TRAP também apresentarem imunomarcagem moderada. Apresentando histomorfometria com trabéculas imaturas e bem irrigadas com grande quantidade de vasos e ausência de infiltrados inflamatórios crônicos ou agudos, fato de grande importância, pois denota que não ocorreu reação inflamatória devido a presença de tetraciclina nos tecidos (GOMES; SANTOS; FERNANDES, 2008; PARK, 2011). Sendo importante notar a ausência de células fibroblásticas e áreas de conjuntivo e ou fibrose. E em ambos os grupos a OPN, que é uma proteína que sinaliza a precipitação do cálcio sobre a matriz colágena, apresentava-se com marcação discreta fato que pode ser devido à ausência neste período de linhas cementantes do tecido ósseo.

Enquanto no mesmo período, GA apresenta-se em um processo de reparo precoce em relação a GT, já que este apresenta-se com ALP, OCN e TRAP com marcação discreta e uma organização celular mais madura. Como GA não apresenta adição de componentes ao implante que possa interferir no processo de reparo, tal dado sugere que a presença ocorreu dissolução de tetraciclina junto ao tecido e a primeiro momento pode estar retardando o processo de reparo. Sendo importante notar também que a presença do TH não afetou negativamente a arquitetura e morfologia dos tecidos assim como não provocou reação inflamatória.

A presença do TH não afetou negativamente a arquitetura e morfologia da dos tecidos ao redor dos implantes. Sabe-se que os efeitos dose-dependência das tetraciclinas nas células em medula óssea humana quando expostos continuamente à doxiciclina (1 e 5 µg / mL) e minociclina (1-10 µg / mL), causa evidente indução de proliferação celular a partir da primeira semana. No entanto, concentrações mais altas de doxiciclina e minociclina impactam negativamente o crescimento celular (Bottino *et al.*, 2017, Gomes *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a quantidade de TH utilizada foi de 0,5%, coincidente com a dose usual clínica e quando liberada aos tecidos não apresentou citotoxicidade fato evidenciado pela ausência de infiltrado inflamatório agudo ou crônico.

Histoquicamente em picrossirius ambos os grupos exibiram fibras colágenas de disposição paralela nas lamelas do osso trabeculado. Com relação a tonalidade,

observa-se uma maior frequência de fibras colágenas com tonalidade amarela; entretanto, ainda prepondera as fibras colágenas de tonalidade vermelha/laranja que condizentes com um tecido em processo de maturação Bigueti *et al.*,2018).

No entanto, no período de 30 dias, ao comparar os grupos observa-se que GT apresenta maior organização tecidual em relação a GA, com corticalização junto as espiras e formação medular inerente ao leito característico da tíbia, o que pode ser efeito dos níveis de TH usados ter desempenhado um papel direto e indireto na viabilidade celular. Enquanto GA apresenta-se ainda em processo de ossificação em nas regiões acompanhando a superfície do implante com formação óssea bem distribuídas, celularizadas e em íntimo contato com o implante

Em ambos os grupos apresentam níveis moderados de ALP ainda aos 30 dias, fato que pode ser explicado pela interação das células com a superfície faz aumentar a expressão de marcadores osteogênicos (BRAMMER; OH; COBB, 2009; GUILAK *et al.*, 2009; NUNE *et al.*, 2018; TRIVEDI; GUPTA; SRIVASTAVA, 2014). Já que a imunomarcção era mais próxima as espiras do implante em GT, enquanto em GA apresentava marcação moderada junto a células osteoblásticas do trabeculado ósseo em formação. Enquanto a análise histoquímica de picrossírius revelou ser condizente com este achado, apresentando um processo de renovação do colágeno no osso. (Bigueti *et al.*,2018; Saraiva *et al.*,2018, Silva *et al.*, 2017) ocorrendo presença de maior frequência de fibras colágenas com tonalidade amarelas associada com aquelas de tonalidade vermelha/alaranjadas no osso superficial. Além de aparecem algumas fibras colágenas com tonalidade verde entremeadas com as fibras colágenas amarelas e vermelhas/laranjas nas trabéculas mais distante da superfície do implante, indicando um processo de renovação do colágeno no osso.

GA apresentou ainda imunomarcção moderada de OCN e TRAP, sendo que a primeira indica diferenciação dos osteoblastos (YONEZAWA *et al.*, 2011) e expressão temporal e maturação de matriz extracelular, como a fibromectina (JIMBO *et al.*, 2007) ou colágeno tipo I (FRANCESCHI; IYER, 1992; JIMBO *et al.*, 2010) que são essenciais para a mineralização. Já TRAP que é uma enzima secretada por osteoclastos durante o processo de reabsorção, denota que existe atividade osteoclastica. Enquanto GT apresentou imunomarcção discreta para OCN e TRAP que indica uma fase de maturação diferente de GA.

Aos 60 dias ambos os grupos apresentam trabéculas maduras e a medula óssea íntegra junto ao espaço medular e osso cortical protegendo as espiras dos implantes. Enquanto GT apresenta OPG e RANK-L com imunomarcagem moderada que pode indicar precipitação de cálcio sob a matriz não mineralizada, devido tais proteínas juntas desativar a osteoclastogênese, (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Já o GA apresentava-se moderado a RANK-L o que pode indicar ativação da osteoclastogênese através da ligação RANK, já que existe a ausência de OPG (MELESSE *et al.*, 2014). A regulação da remodelação óssea via osteoclastos é uma das funções essenciais do tecido ósseo maduro, em que RANK, RANKL e OPG fazem parte deste processo, demonstrando tendência de um equilíbrio dos tecidos de ambos os grupos, já que existe um processo dinâmico de reabsorção e deposição óssea, para que ocorra a homeostase do organismo (BEHERA *et al.*, 2017; BOYCE *et al.*, 2012; CONSOLARO *et al.*, 2009).

Sendo que esta maturidade dos tecidos também pode ser comprovada pelos resultados da histoquímica da coloração Picrosirius Red em que as fibras se encontram paralelas e organizadas nas trabéculas; além de intensa coloração vermelho alaranjada, característicos de fibras maduras e em processo de equilíbrio (Bigueti *et al.*, 2018; Saraiva *et al.*, 2018, Silva *et al.*, 2017).

Dentro de seus limites, os presentes resultados apontam para a elevada sequência dinâmica dos processos biológicos nos primeiros 30 dias após a inserção do implante em ambos os grupos, tendendo ao equilíbrio aos 60 dias.

5 CONCLUSÃO

A superfície ativada pela tetraciclina se mostrou biocompatível, com ausência de reações inflamatórias junto ao tecido peri-implantar e uma ossificação adequada, sendo qualitativamente e quantitativamente superior ao grupo controle, sugerindo uma osseointegração precoce.

REFERÊNCIAS

- Abed AM, Farhad SZ, Farhad A, Barekatin M, Mafi M, Abooie MS. Debris and smear layer removal efficacy and changes in morphology of dentinal tubules after using citric acid, tetracycline-hydrochloride and mixture of tetracycline and acid and detergent. *Dent Res J*. 2013;10(2):232-7.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981;10(6):387-416.
- 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.
- 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 Jun;20(6):1215-22.
- Behera J, Bala J, Nuru M, Tyagi SC, Tyagi N. Homocysteine as a pathological biomarker for bone disease. *J Cell Physiol*. 2017;232(10):2704-2709.
- Bigueti CC, Cavalla F, Silveira EM, Fonseca AC, Vieira AE, Tabanez AP, Rodrigues DC, Trombone APF, Garlet GP. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jun 11;26:e20170601.
- Bondarenko S, Ashukina N, Maltseva V, Ivanov G, Badnaoui AA, Schwarzkopf R. Evaluation of the bone morphology around four types of porous metal implants placed in distal femur of ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res*. 2020;15(1):296.
- Bottino MC, Münchow EA, Albuquerque MTP, Kamocki K, Shahi R, Gregory RL, Chu TG, Pankajakshan D. Tetracycline-incorporated polymer nanofibers as a potential dental implant surface modifier. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Oct;105(7):2085-2092.
- Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Ann Rev Mater Res*. 2001;31:357-71.

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(12):1332-41.

Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surface Sci.* 2007;253(23):9203-8.

Brammer KS, Oh S, Cobb CJ. Improved bone forming functionality on diameter controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater.* 2009; 5(8):3215-23.

Brånemark PI. Capillary form and function. The microcirculation of granulation tissue. *Bibl Anat.* 1965;7:9-28.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.

Brunton L, Goodman L, Gilman A, Knollmann B, Chabner, B. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman.* 12th ed. Porto Alegre: AMGH; 2012.

Buser D, Broggin N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004;83(7):529-33.

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.

Consolaro A, Sant'Ana E, Lawall MA, Consolaro MF, Bacchi CE. Gingival juvenile xanthogranuloma in an adult patient: case report with immunohistochemical analysis and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(2):246-52.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998;11(5):391-401.

Donos N, Hamlet S, Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Bosshardt DD, Ivanovski S. Gene expression profile of osseointegration of a hydrophilic compared with a hydrophobic microrough implant surface. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(4):365-72.

- Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7(2):235-46.
- Gabler WL, Creamer HR. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *J Periodontal Res.* 1991;26(1):52-8.
- Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014;10(7):2907-18.
- Gomes PS, Santos JD, Fernandes MH. Cell-induced response by tetracyclines on human bone marrow colonized hydroxyapatite and Bonelike. *Acta Biomater.* 2008;4(3):630-7.
- 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.
- Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell.* 2009;5(1):17-26.
- Hamlet S, Alfarsi M, George R, Ivanovski S. The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(5):584-90.
- Hong J, Kurt S, Thor A. A hydrophilic dental implant surface exhibits thrombogenic properties in vitro. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(1):105-12.
- Jimbo R, Ivarsson M, Koskela A, Sul YT, Johansson CB. Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces. *J Oral Maxillofac Res.* 2010;1(3):e3.
- Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials.* 2007;28(24):3469-77.
- Kato H, Nakamura T, Nishiguchi S, Matsusue Y, Kobayashi M, Miyazaki T, Kim HM, Kokubo T. Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(1):28-35.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):256-60

Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(4):350-7.

Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8(6):442-7.

Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006; 27(15):2907-15.

Kumar PS, Ks SK, Grandhi VV, Gupta V. The effects of titanium implant surface topography on osseointegration: literature review. *JMIR Biomed Eng*. 2019;4(1):e13237

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23(7):844-54.

Lewandrowski KU, Bondre SP, Gresser JD, Wise DL, Tomford WW, Trantolo DJ. Improved osteoconduction of cortical bone grafts by biodegradable foam coating. *Biomed Mater Eng*. 1999;9(5-6):265-75.

Libin BM, Ward HL, Fishman L. Decalcified, lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects. *J Periodontol*. 1975;46(1):51-6.

Lin C, Dong QS, Wang L, Zhang JR, Wu LA, Liu BL. Dental implants with the periodontium: a new approach for the restoration of missing teeth. *Med Hypotheses*. 2009;72(1):58-61.

Maia FR, Bidarra SJ, Granja PL, Barrias CC. Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties. *Acta Biomater*. 2013;9(11):8773-89.

Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):205-26.

Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(6):650-6.

Melesse M, Choi E, Hall H, Walsh MJ, Geer MA, Hall MC. Timely activation of budding yeast APCCdh1 involves degradation of its inhibitor, Acm1, by an unconventional proteolytic mechanism. *PLoS One.* 2014;9(7):e103517.

Mistry S, Roy S, Jyoti MN, 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.

Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(7):831-7.

Nagata MJH, Bosco A, Leite CM, Sundefeld MLMM. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. *J Periodontol.* 2005;76(6):908-14.

Nune KC, Misra R, Gai X, Li SJ, Hao YL. Surface nanotopography-induced favorable modulation of bioactivity and osteoconductive potential of anodized 3D printed Ti-6Al-4V alloy mesh structure. *J Biomater Appl.* 2018;32(8):1032-48.

Oliveira MC, Arntz OJ, Blaney Davidson EN, van Lent PL, Koenders MI, van der Kraan PM, van den Berg WB, Ferreira AV, van de Loo FA. Milk extracellular vesicles accelerate osteoblastogenesis but impair bone matrix formation. *J Nutr Biochem.* 2016;30:74-84.

Orsini E, Giavaresi G, Trirè A, Ottani V, Salgarello S. Dental implant thread pitch and its influence on the osseointegration process: an in vivo comparison study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012;27(2):383-92.

Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, Freire A, Faverani LP, Sumida DH, Okamoto R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170470

Palmquist A, Engqvist H, Lausmaa P. Commercially available dental implants: review of their surface characteristics. *J Biomater Tissue Eng.* 2012;2(2):112-24.

Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface.* 2010;7(Suppl 5):S515-27.

Park JB. Effects of doxycycline, minocycline, and tetracycline on cell proliferation, differentiation, and protein expression in osteoprecursor cells. *J Craniofac Surg.* 2011;22(5):1839-42.

Park J, Lakes RS. *Biomaterials. An introduction.* 3rd ed. New York: Springer Surface; 2007.

Parvizi J, Wickstrom E, Zeiger AR, Adams CS, Shapiro IM, Purtill JJ, Sharkey PF, Hozack WJ, Rothman RH, Hickok NJ. Frank Stinchfield Award. Titanium surface with biologic activity against infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(429):33-8.

Pietrzak WS, Dow M, Gomez J, Soulvie M, Tsiagalis G. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(4):653-61.

Plecko M, Sievert C, Andermatt D, Frigg R, Kronen P, Klein K, Stübinger S, Nuss K, Bürki A, Ferguson S, Stoeckle U, von Rechenberg B. Osseointegration and biocompatibility of different metal implants - a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:32.

Queiroz TP, Souza FA, Gustaldi 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.

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Rezende ML, Consolaro A, Sant'Ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Passanezi E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. *J Periodontol.* 2014;85(5):e121-9.

Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis.* 2003;36(4):462-7.

Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):258-65.

Saraiva JA, da Fonseca TS, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater.* 2018 Feb 20;13(3):035002.

Sartoretto SC, Alves AT, Resende RF, Calasans-Maia J, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):279-87.

Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(24):4353-64.

Shrestha S, Joshi S. Current concepts in biomaterials in dental implant. *Sci Res.* 2014;2(1):7-12.

Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e95-e108.

Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, Nishioka RS, Sisti KE, Sonoda CK. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(1):76-84.

Stach RM, Kohles SS. A meta-analysis examining the clinical survivability of machined-surfaced and osseotite implants in poor-quality bone. *Implant Dent.* 2003;12(1):87-96.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17 Suppl 2:68-81.

- Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseointegrated implant surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002;22(6):535-45.
- Trivedi P, Gupta P, Srivastava S. Characterization and in vitro biocompatibility study of ti-Si-N nanocomposite coatings developed by using physical vapor deposition. *App Surf Sci*. 2014;293:143-50.
- Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop Relat Res*. 1968;59:59-96.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
- Valverde GB, Jimbo R, Teixeira HS, Bonfante EA, Janal MN, Coelho PG. Evaluation of surface roughness as a function of multiple blasting processing variables. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(2):238-42.
- Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone*. 2009;45(1):17-26.
- Wei E, Her-Hsiung H. Multiform TiO₂ nano-network enhances biological response to titanium surface for dental implant applications. *App Surf Sci*. 2019;471:1041-52.
- Wen HB, Wolke JG, de Wijn JR, Liu Q, Cui FZ, de Groot K. Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. *Biomaterials*. 1997;18(22):1471-8.
- Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
- Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, DiFlorio RM, Terranova VP. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res*. 1986;21(4):322-9.
- Witek L, Tovar N, Lopez CD, Morcos J, Bowers M, Petrova RS, Coelho PG. Assessing osseointegration of metallic implants with boronized surface treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(3):e311-e317.

Yonezawa T, Lee JW, Hibino A, Asai M, Hojo H, Cha BY, Teruya T, Nagai K, Chung UI, Yagasaki K, Woo JT. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(2):260-5.

Zareidoost A, Yousefpour M, Ghaseme B, Amanzadeh A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(6):1479-88.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74(1):49-58.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"		F.R. 43 PROJ. 51117 PUS 10/8
	CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação do processo de reparo perimplantar em implantes de superfícies de titânio com e sem tratamento de adição de tetraciclina. Estudo experimental biomecânico, topográfico, histométrico e imunohistoquímico"**, Processo FOA nº 00574-2017, 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 21 de Novembro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 21 de Novembro de 2020.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 21 de Dezembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the perimplant repair process of implants of titanium surfaces with no addition of tetracycline treatment. Biomechanical, topographic, histometric and immunohistochemical study"**, Protocol FOA nº 00574-2017, 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 November 21, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 21, 2020.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 21, 2020.


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

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

ANEXO B – FOTOS PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A: ASSEPSIA;

B: INCISÃO;

C: POSICIONAMENTO DA PONTA LANÇA;

D: FRESAGEM;

E: IMPLANTE EM POSIÇÃO;

F: SUTURA EM PONTOS INTERROMPIDOS.

