



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



**IAGO GUERRA DA SILVA**

**Análise de um novo método de texturização de superfície de implantes dentários à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico no reparo ósseo em ratos diabéticos**

Araçatuba – SP

2023

**IAGO GUERRA DA SILVA**

**Análise de um novo método de texturização de superfície de implantes dentários à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico no reparo ósseo em ratos diabéticos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Farnezi Bassi.

Araçatuba – SP

2023

*Este trabalho é todo dedicado à minha mãe e aos meus irmãos, pois é graças aos seus esforços que hoje posso concluir o meu curso.*

*À minha mãe, **Hilda Guerra da Silva**, meu exemplo de superação, compreensão e determinação. Com você aprendi que nenhum desafio é impossível quando se tem fé e coragem, e que toda trajetória se torna mais leve quando realizamos as coisas com amor e dedicação. Sua forma pura e bondosa te faz essa pessoa tão especial e tão querida por todos, ser seu filho é um orgulho. Só tenho a agradecer por tudo que fez e faz por mim e por todos nós e que não hesitou de renunciar a tantas coisas para que eu e meus irmãos desfrutássemos de uma vida boa e feliz, espero um dia poder retribuir todo amor e cuidado que você tem nos dedicado.*

*A meu pai **Jorge Luis da Silva (in memoriam)**, que sempre me ensinou o real valor das coisas simples da vida, bem como a honestidade e a determinação. Desde muito novo você me ensinou o real valor do amor e agradecer sempre tudo o que temos e com isso correr atrás dos nossos sonhos e não abaixar a cabeça frente as adversidades. Sou muito grato por todas as coisas que você fez pela nossa família e gostaria que de onde você estiver, possa contemplar esse momento único com todos nós.*

*E aos meus irmãos, **Itamar Luiz Guerra da Silva e Igor Guerra da Silva**, quem foram decisivos nesse momento da minha vida, por toda contribuição de diferentes modos e que não hesitaram em somar forças para que hoje, após todas as dificuldades passadas, podemos hoje contemplar esse momento único em nossas vidas, sem vocês essa conquista não seria possível, diante disso sou eternamente grato a vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus**, por me conceder a vida com saúde e força durante esta jornada e por colocar pessoas iluminadas no meu caminho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**, pela oportunidade de aprender todos os dias com o senhor e por ter sua amizade. Foi através de suas explicações que tive a certeza de que meu caminho deveria ser percorrido através da cirurgia e por ter a honra de ser seu aluno orientado. O seu modo de ensinar e seu carinho com os alunos o fazem tão querido e admirado por todos nós, sendo uma inspiração para nossas vidas. Sou eternamente agradecido pela confiança que o senhor deposita em mim e por todas as oportunidades que já me concedeu, por todo crescimento que tive durante essa etapa ao seu lado e ao carinho com que sempre me tratou. Muito obrigado por tudo professor, tenho muito apreço pela sua pessoa.

Às **Professoras Dras. Ana Paula Farnezi Bassi e Daniela Ponzoni**, a qual tenho grande admiração e respeito por vocês, exemplos de dedicação, responsabilidade e competência e que me fizeram entender que sucesso está aliado ao empenho e a humildade. Só tenho a agradecer pelo privilégio de ter sido aluno dessas professoras incríveis e por todo carinho e respeito recebido.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara**, pelo privilégio de realizar minha graduação em uma faculdade de excelência e com professores tão acolhedores. Agradeço a todos os professores que fizeram parte desta jornada e me conduziram a formação profissional, em especial

aos professores **Paulo Roberto Botacin, José Américo de Oliveira, Roberta Okamoto, Edilson Ervolino, Éleron Gaetti Jardim-Júnior, Antônio Hernandes Chaves-Neto, Fernando Yamamoto Chiba, Ronald Jefferson Martins, Paulo Henrique dos Santos, Aimeé Maria Guiotti, Maria Cristina Rosifini Alves-Rezende, Sandra Penha de Oliveira, Cristina Antonialli Silva, Daniel Galera Bernabé, Ricardo Coelho Okida, João Eduardo Gomes Filho, Juliano Milanezi de Almeida, Eduardo Passos Rocha, Karina Helga Túrcio de Carvalho, Daniele Micheline dos Santos, Wirley Gonçalves Assunção, Marcos Rogério de Mendonça, André Pinheiro de Magalhães Bertoz, Luiza Monzoli Côvre, Aline Satie Takamiya, Daniela Atili Brandini de Weert, Celso Koogi Sonoda, Caio Sampaio, Thayse Yumi Hosida, Jackeline Gallo do Amaral e a Cristiane Duque** por todo carinho, respeito e atenção pelos conhecimentos fornecidos durante essa etapa.

À **Pró-reitoria de Extensão Universitária e Cultura (PROEX – UNESP)**, por me conceder uma bolsa durante dez meses (2021) para o desenvolvimento do projeto “Prevenção e recuperação da Saúde Bucal de crianças e adolescentes em situação de risco social da Associação João Arlindo”.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, (Processo 2022/01959-9) pelo grande incentivo, no formato de bolsa de iniciação científica, durante um ano da minha graduação.

Aos alunos da pós-graduação **orientados pelo professor Leonardo Faverani**, por toda a paciência, carinho e compromisso com o ensino, em especial a doutoranda **Stéfany Barbosa** e ao **Eduardo Dallazen**, que me incentivaram e forneceram todo suporte para o caminho da

pesquisa. Desde o início vocês sempre me trataram com muito respeito e carinho em me ensinar cada item e detalhe importante para que um trabalho seja bem realizado. Agradeço por toda amizade, ajuda, oportunidades oferecidas e pela honra de dividir esse trabalho com vocês, serei eternamente grato. A doutoranda **Bárbara Ribeiro Rios**, muito obrigada por dividir suas experiências comigo e por fazer isso de uma forma muito humana, amigável e ímpar. Agradeço aos mestrandos **João Matheus Fonseca e Santos, Mirela Caroline Silva** e ao **Olavo Alcaide Panigali** pela amizade desenvolvida, pelas oportunidades que me deram e pela honra de estar com vocês a cada dia. A todos vocês, fica o meu respeito, carinho e o desejo de que tenham um caminho feliz e de muito sucesso, muito obrigado a todos vocês.

Às minhas duplas de clínica, **Bruna do Amaral, Gustavo Ramos Schiavetti, Isadora Romão Barreto, João Paulo Catarin, Karen Santin dos Reis, Larissa Pinheiro Viana, Maria Bethânia Ramos Calsavara e Maria Eduarda Silva Fernandes**, que foram sensacionais os dias de aprendizado ao lado de vocês e fico muito agradecido pela amizade e pelo comprometimento que sempre tiveram.

Aos amigos rancharienses, **Antônio Pereira da Silva Neto, Lucas Vascelli Maciel, Murilo Silva de Meira e Victor Antônio Pascotto Rodrigues** e ao meu amigo de faculdade **Jhonatan William Ferreira dos Santos** que durante essa jornada sempre me apoiaram e os quais pude compartilhar momentos únicos, saibam que sou eternamente grato a amizade de vocês.

A **todos os funcionários da FOA** por sempre estarem a disposição para nos ajudar, pelo respeito e amizade com os alunos durante esta jornada.

Aos **pacientes**, pela confiança em nós depositada e pela generosidade de auxiliar na construção do aprendizado no decorrer dessa jornada, agradeço imensamente a cada um de vocês.

***“Trabalhar na área da saúde é um princípio: permite ser útil à sociedade com toda a força e conhecimento que se tem. Este serviço à sociedade deve ser consequência da vocação e do compromisso ao graduar-se”***

***(Jacinto Convit)***

SILVA, I.G. **Análise de um novo método de texturização de superfície de implantes dentários à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico no reparo ósseo em ratos diabéticos.** 2023. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## RESUMO

Visando confirmar os efeitos promissores verificados *in vitro* do recém desenvolvido revestimento à base de vidro bioativo (PEO-BG), o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade osteoindutora do revestimento PEO-BG sintetizado via oxidação por plasma eletrolítico na neoformação óssea de ratos diabéticos. Para isso, implantes de titânio comercialmente puro (TiCp) foram revestidos por PEO-BG (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; m/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, ciclo de trabalho de 10%, 420 s). Inicialmente, caracterizações de superfície foram conduzidas para confirmar a morfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV), topografia (Microscopia Confocal de Varredura à Laser - CLSM) composição química (Espectroscopia de Energia Dispersiva - EDS) e propriedades físico-químicas (Perfilometria e Molhabilidade) das amostras. Em seguida, o estudo *in vivo* foi conduzido utilizando ratos Wistar (n = 15) e um protocolo de indução da diabetes mellitus pela administração de estreptozotocina (35 mg / kg) foi empregado. Após 30 dias de indução da diabetes, os animais foram randomizados e alocados para instalação de implantes. Os ratos foram submetidos a cirurgia de instalação de implantes em tibia (30 implantes), recebendo um implante teste (PEO-BG) e um implante controle (ZrAc)

em cada tíbia. Os animais foram eutanasiados (14 e 28 dias) e as peças encaminhadas para escaneamento por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT), análise histológica (HE) e de imunistoquímica (RUNX2, OPG, RANKL e OC). Os resultados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado para  $<0,05$ . Os resultados *in vitro* demonstraram uma superfície diferenciada para PEO-BG, com maior área de contato e maior molhabilidade. Com relação aos dados *in vivo*, através da análise histológica foi observado maior área de osso neoformado e maior área de contato osso-implante para o grupo PEO-BG ( $p<0,05$ ), com perfil inflamatório compatível com as fases do reparo tecidual. A microtomografia computadorizada (Micro-CT) demonstrou parâmetros de volume ósseo bastante favoráveis quando comparado a PEO-BG. As expressões de BMP-2, RANKL, OPG e OCN corroboraram com os resultados de formação óssea. Assim, é possível concluir que o revestimento de vidro bioativo apresentou efeito osteoindutor, ou seja, capaz de induzir células de diferenciação, a partir de células indiferenciadas do hospedeiro em tecido ósseo, sendo capaz de otimizar o reparo ósseo periimplantar.

**Palavras-chave:** Regeneração óssea; Materiais revestidos biocompatíveis; Diabetes; Implantes Dentários.

SILVA, I.G. 2023. 62 f. **Analysis of a new method for surface texturing of dental implants based on bioactive glass via electrolytic plasma oxidation in bone repair in diabetic rats.**

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

### **ABSTRACT**

Aiming to confirm the promising effects verified in vitro of the newly developed coating based on bioactive glass (PEO-BG), the present study aimed to evaluate the osteoinductive capacity of the PEO-BG coating synthesized via oxidation by electrolytic plasma on new bone formation in diabetic rats. For this, implants of commercially pure titanium (TiCp) were coated with PEO-BG (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; m/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, duty cycle of 10 %, 420 sec). Initially, surface characterizations were conducted to confirm the morphology (Scanning Electron Microscopy - SEM), topography (Confocal Laser Scanning Microscopy - CLSM) chemical composition (Energy Dispersive Spectroscopy - EDS) and physical-chemical properties (Perfilometry and Wettability) of the samples. Then, the in vivo study was conducted using Wistar rats (n = 15) and a protocol of induction of diabetes mellitus by administering streptozotocin (35 mg/kg) was employed. After 30 days of diabetes induction, the animals were randomized and allocated for implant placement. The rats underwent surgery to install implants in the tibia (30 implants), receiving a test implant (PEO-BG) and a control implant (ZrAc) in each tibia. The animals were euthanized (14 and 28 days) and the pieces sent for scanning by Computerized Microtomography (Micro-CT), histological analysis (HE) and

immunohistochemistry (RUNX2, OPG, RANKL and OC). Quantitative results were subjected to a normality test (Shapiro-Wilk) and a parametric or non-parametric test was applied for  $<0.05$ . The in vitro results demonstrated a differentiated surface for PEO-BG, with a larger contact area and greater wettability. Regarding the in vivo data, through the histological analysis, a greater area of newly formed bone and a greater area of bone-implant contact was observed for the PEO-BG group ( $p<0.05$ ), with an inflammatory profile compatible with the phases of tissue repair. Computed microtomography (Micro-CT) demonstrated very favorable bone volume parameters when compared to PEO-BG. BMP-2, RANKL, OPG and OCN expressions corroborated the bone formation results. Thus, it is possible to conclude that the bioactive glass coating had an osteoinductive effect, that is, capable of inducing differentiation cells from undifferentiated host cells in bone tissue, being able to optimize peri-implant bone repair.

**Keywords:** Bone regeneration; Biocompatible coated materials; Diabetes; Dental implants.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Demonstração macroscópica (A) e microscópica (B) da ação do perfilômetro durante a análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo.....21
- Figura 2 - Goniômetro utilizado para as análises de molhabilidade e energia livre de superfície (A), sendo demonstrado a ponteira responsável pela aplicação da gota na superfície do disco testado (B) e a imagem capturada pelo programa após a mensuração dos ângulos formados. ....22
- Figura 3 - Representação clínica do procedimento de aplicação de estreptozotocina via veia peniana. ....24
- Figura 4 - Visão geral do programa ODR – ATA, representando as ferramentas no canto inferior e o simulador tridimensional gerado a partir da seleção.....25
- Figura 5 - Imagem representativa do posicionamento da amostra óssea e da célula de carga utilizada para aplicação de força vertical.....26
- Figura 6 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial. (B) Exposição da musculatura sobreposta a metáfise tibial. (C) Metáfise tibial exposta. (D) Preparo do leito ósseo E) Instalação dos implantes com rosqueamento digital (demonstrado com implante do grupo ZrAC). (F) Representação do posicionamento final do implante bicorticalizado (demonstrado com implante do grupo PEO-BG). ....28
- Figura 7 – Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das superfícies utilizadas no estudo, imagens bidimensionais da análise de CLSM em magnitude de 20x.....33

|  |    |
|--|----|
| Figura 8 - Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das superfícies, imagens tridimensionais de CLSM em magnitude de 50x.<br>.....  | 34 |
| Figura 9 - Mapa de cores da proporção atômica dos componentes presentes na superfície.....   | 35 |
| Figura 10 - Valores de rugosidade dos grupos experimentais. Representação gráfica dos valores de ângulo de contato com a água. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*). ....  | 35 |
| Figura 11 - Representação dos resultados obtidos através do programa computacional ODR-ATA. (A) Imagens tridimensionais das amostras ósseas utilizadas para avaliação. (B) Resultados de densitometria radiográfica para as amostras de fêmur e tíbia.....   | 36 |
| Figura 12 - Imagens gráficas referentes aos resultados da análise biomecânica de caracterização do tecido ósseo dos animais diabéticos em comparação com animais saudáveis, através da utilização de tíbias e fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures. (B) Resultado de rigidez das tíbias. (C) Força máxima para os fêmures. (D) Força máxima para as tíbias. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*). ....                      | 37 |
| Figura 13 - Imagens referentes a análise histológica das amostras de implantes instalados em tíbias. (A) Fotomicrografias representativas em magnitudes de 10x, 40x e 100x, respectivamente. (B) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (C) Representação gráfica de contagem de vasos sanguíneos. As setas pretas demonstram o padrão de célula que foi considerada na contagem (linfócitos). TO – Tecido ósseo; TC- Tecido conjuntivo; A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*). .... | 38 |
| Figura 14 - Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (B) Representação gráfica de contagem de vasos sanguíneos. As setas pretas   |    |

demonstram o padrão de célula que foi considerada na contagem (linfócitos). A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).....39

Figura 15 - Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcação das respectivas proteínas.....  
40

Figura 16 - (A) Valores de imunomarcação de BMP-2. (B) Valores de imunomarcação de OPG. (C) Valores de imunomarcação de RANKL. (D) Valores de imunomarcação de OCN. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*) .... 40

Figura 17 - Imagens referentes a análise microtomográfica, representação tridimensional da área óssea ao redor do implante.....41

Figura 18 – (A) Representação gráfica dos valores de volume ósseo (BV). (B) Representação gráfica da porcentagem de volume ósseo (BV/TV). (C) Representação gráfica dos valores de espessura do trabeculado ósseo (Tb. Th). (D) Representação gráfica de separação das trabéculas ósseas. (E) Representação gráfica do número de trabéculas (Tb. N). A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*) .....42

## LISTA DE ABREVIATURAS

|      |   |
|------|---|
| PTH  | Hormônio da Paratireoide  |
| PEO  | Oxidação por Plasma Eletrolítico                                    |
| ZrAc | Superfície Tratada por Jateamento com Zircônia e Duplo Ataque Ácido |
| CSLM | Microscopia Confocal de Varredura a Laser                           |
| EDS  | Espectroscopia de Energia Dispersiva                                |
| Ticp | Titânio Comercialmente Puro   |
| HE   | Hematoxilina e Eosina   |
| DMO  | Densidade Mineral Óssea   |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 15 |
| 2 OBJETIVOS .....   | 18 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 18 |
| 3.1 Texturização de superfície das amostras .....   | 19 |
| 3.1.1 Revestimento à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico<br>..... | 19 |
| 3.2 Caracterizações de superfície .....   | 20 |
| 3.2.1 Microscopia confocal de varredura a laser 3D (CLSM) .....                           | 21 |
| 3.2.2 Perfilometria (rugosidade de superfície) .....                                      | 21 |
| 3.2.3 Molhabilidade e energia livre de superfície .....                                   | 22 |
| 3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva .....  | 22 |
| 3.3 Desenho experimental do modelo animal.....  | 23 |
| 3.3.1 Indução de diabetes mellitus em ratos Wistar .....                                  | 24 |
| 3.3.2 Análises comprobatórias da redução da densidade mineral óssea .....                 | 25 |
| 3.3.3 Análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos) .....                          | 26 |
| 3.3.4 Cirurgia de instalação de implantes em tíbia .....                                  | 27 |
| 3.4 Métodos de análise .....  | 29 |
| 4 ANÁLISE DE TECIDOS DESCALCIFICADOS – Grupo A .....                                      | 29 |
| 4.1 Análise Histológica .....   | 29 |
| 4.1.1 Avaliação Quantitativa do Tecido Ósseo .....  | 30 |
| 4.1.2. Avaliação Qualitativa do Tecido Ósseo .....  | 30 |
| 4.1.3. Avaliação do Perfil Inflamatório .....   | 30 |
| 4.2 Análise Imunoistoquímica .....  | 30 |
| 5 ANÁLISE DE TECIDOS CALCIFICADOS – Grupo B .....   | 31 |
| 5.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct) .....                                      | 31 |
| 5.2 Processamento EXAKT – confecção de lâminas calcificadas .....                         | 34 |
| 5.3 Área de Deposição de Fluorocromos – Dinamismo Ósseo .....                             | 35 |
| 5.4 Análise Histométrica .....  | 35 |
| 5.5 Planejamento Estatístico .....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 6 RESULTADOS .....  | 32 |
| 6.1 Caracterização topográfica .....  | 36 |
| 6.1.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM) .....                                 | 33 |
| 6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....  | 34 |
| 6.1.3 Rugosidade de superfície .....  | 33 |
| 6.1.4 Ângulo de contato – água .....  | 35 |
| 6.2 Estudo in vivo .....  | 36 |
| 6.2.1. Densitometria radiográfica – Programa ODR – ATA .....                                    | 36 |
| 6.2.2 Análise comprobatória de redução da DMO – Biomecânica .....                               | 37 |
| 6.3 Estudo De Osseointegração – Implantes Análise De Tecidos Descalcificados –<br>Grupo A ..... | 37 |
| 6.3.1 Análise histológica .....   | 38 |
| 6.3.2 Análise imunoistoquímica .....  | 39 |
| 6.4 Análise De Tecidos Calcificados .....   | 41 |
| 6.4.1 Análise microtomográfica .....  | 41 |
| 7 DISCUSSÃO .....   | 44 |
| 8 CONCLUSÃO .....   | 50 |
| REFERÊNCIAS .....   | 51 |

## 1 INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um processo com determinada complexidade que demanda de interações celulares, disponibilidade de citocinas, matriz osteocondutora e de um bom suprimento vascular para que ocorra adequadamente<sup>1</sup>. Nesse contexto, os implantodontistas encontram entraves nas reabilitações orais, visto a qualidade óssea afetada, vascularização e a capacidade de remodelação, fatores esses que refletem diretamente no prognóstico.<sup>1,5</sup> Logo, a somatória de todos esses itens aumenta as chances de infecções, afetando a osseointegração e a consequente perda de implantes.

Na literatura, também é bem estabelecido que alguns fatores locais do hospedeiro podem interferir diretamente na qualidade do tratamento como a qualidade óssea, localização anatômica, presença de infecções locais e até mesmo a influência de alguns protocolos terapêuticos sistêmicos, como as medicações antirreabsortivas.<sup>10,12</sup> Além destes fatores, é importante frisar que alterações sistêmicas como a diabetes mellitus, artrite reumatoide, desnutrição, anemia, hipovitaminoses, osteopenia, osteoporose e anemia podem influenciar negativamente no reparo ósseo.<sup>12,14</sup>

Dentre as condições sistêmicas mencionadas, a diabetes mellitus é uma doença que afeta o metabolismo ósseo diretamente, modificando a expressão gênica associada à atividade dos osteoblastos e inibindo a maturação e metabolismo de células tronco mesenquimais. Adicionalmente, a diabetes ocasiona uma redução nos níveis de Vitamina D e consequente aumento na liberação de Paratormônio (PTH), o que estimula a atividade osteoclastogênica e aumenta o risco de fraturas.<sup>15,17</sup> Consequentemente, o paciente com diabetes apresenta uma inflamação tecidual crônica e dificuldade de cicatrização generalizada, apresentando uma qualidade óssea ruim e baixa renovação do tecido ósseo. Desta forma, a diabetes é uma condição crítica para a instalação de implantes osseointegráveis.<sup>12,18,19</sup>

Como alternativa de superar este problema e aumentar a sobrevivência dos tratamentos, estratégias terapêuticas visando aprimorar o processo de reparação óssea em pacientes portadores de diabetes mellitus vem sendo amplamente investigado na área biomédica. Dentre as possíveis estratégias, os revestimentos de superfície têm sido amplamente investigados em diferentes sistemas de implantes e componentes protéticos e, recentemente, também em miniplacas de Ti.<sup>20</sup> De modo geral, os revestimentos de superfícies são produzidos por diferentes métodos de síntese, demonstrando comportamento ósseo superior in vitro, quando comparado com superfícies usinadas (sem tratamento).<sup>21, 23</sup> Estes achados são atribuídos as melhores propriedades mecânicas, físico-químicas e resistência à corrosão, sendo importantes características quando se almeja a neoformação óssea em condições desafiadoras como no cenário da diabetes.<sup>22,24,25</sup>

Dentre as inúmeras técnicas de revestimento existentes, a oxidação por plasma eletrolítico (PEO)<sup>26,27</sup> tem sido empregada pelo nosso grupo<sup>20,28,30</sup> e por outros grupos<sup>31, 33</sup>, como uma via para maximizar o potencial de osseointegração de dispositivos biomédicos implantáveis. Conceitualmente, o PEO é um método simples de processos eletroquímicos de oxidação que permite a formação de topografias complexas (em escala  $\mu\text{m}$ ), modificando as propriedades superfícies do material (rugosidade, molhabilidade, energia livre de superfície e/ou camada de óxido). Em termos de reparo ósseo, estudos in vitro têm evidenciado que a complexa topografia dos revestimentos de PEO proporcionam uma maior superfície de contato, conseqüentemente, favorecem uma melhor interação de proteínas e células humanas com a superfície experimental.<sup>34,35</sup> Este mecanismo foi também testado in vivo, demonstrando que superfícies tratadas com PEO, de fato, aumentam a área de contato entre osso/implante, acelerando o reparo tecidual e promovendo uma maior área de osso neoformado em fraturas femorais, quando comparado a superfícies comercialmente disponíveis.<sup>20,28,30</sup> Ainda, o PEO é um método eficiente para incorporar também elementos bioativos visando potencializar os efeitos benéficos obtidos por meio das modificações de superfície.

Nesta perspectiva, o estudo prévio de Costa *et al.*<sup>36</sup> desenvolveu e caracterizou, pela primeira vez na literatura, um revestimento para implantes dentários bioinspirado na composição do biovidro 45S5-bioglass®. Esse revestimento (PEO-BG) foi produzido por PEO sobre a superfície de discos de Ti utilizando agentes precursores do 45S5-bioglass® em solução eletrolítica (SiO<sub>2</sub>, CaO, NaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). O PEO-BG mostrou ser altamente aderente ao substrato, com alta resistência à corrosão e ao desgaste tribológico, importantes características anteriormente não atingidas por outros métodos de deposição. Além disso, PEO-BG apresenta biocompatibilidade com células humanas e mecanismos biológicos *in vitro* semelhantes ao 45S5- bioglass®. Em síntese, os efeitos biológicos são baseados na lixiviação de íons bioativos (Si, Ca, P e Na) do PEO-BG, que leva ao aumento do pH do meio e, conseqüentemente, a precipitação mais rápida de uma camada de apatita e a maior adsorção de proteínas do plasma sanguíneo. Portanto, o PEO-BG possui características positivas e superiores para osseointegração e neoformação óssea (36), quando comparado com superfícies controle: maquinada ou comercial (jateamento de alumínio seguido de ataque ácido; SLA).

Assim, tendo em vista os excelentes resultados encontrados *in vitro*, para confirmar que a superfície PEO-BG desenvolvida é promissora para aplicações biomédicas, é de suma importância avaliar o desempenho deste revestimento em modelos animais capazes de captar todo o espectro de interações com o hospedeiro e comprovar a possível estimulação de células osteogênicas para a produção de matriz óssea *in vivo*. Além disso, foi hipotetizado que o PEO-BG poderia promover habilidades osteoindutivas e osteocondutivas devido ao mecanismo de liberação iônica, o que ainda não havia sido estudado considerando amostras de implantes dentários em situações críticas de reparo ósseo, como o que foi simulado pelo uso de modelo animal diabético como desenvolvido neste estudo.<sup>36</sup>

## 2 OBJETIVOS

O presente teve como objetivo geral avaliar a capacidade osteoindutora de implantes com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos. Os objetivos específicos desse estudo foram:

- 1) Sintetizar revestimentos de PEO-BG em implantes de Tícp por meio do PEO;
- 2) Caracterizar as superfícies experimentais em termos de morfologia, topografia, composição química e propriedades físico-químicas;
- 3) Avaliar *in vivo* o efeito modulatório da resposta imune inflamatória do hospedeiro na presença do revestimento PEO-BG em tecidos descalcificados;
- 4) Investigar *in vivo* o potencial de osseointegração na presença de implantes revestidos com PEO-BG.

A hipótese nula desta pesquisa é que o tipo de texturização não influenciaria nos parâmetros reparacionais a serem analisados

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, 18 implantes de titânio comercialmente puro, grau 4, foram fornecidos pela empresa DSP (DSP Biomedical, Ouro Verde II, Campo Largo – PR) com superfície tratada por jateamento com zircônia e duplo ataque ácido, de modo comercialmente disponível e seguindo os parâmetros da empresa e representando a superfície denominada de ZrAC. Além disso, a mesma empresa, forneceu 18 implantes de superfície lisa, ou seja, sem nenhum tipo de texturização, que posteriormente foram encaminhados para receber o revestimento à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico (PEO-BG).

Para o estudo em modelo animal, 15 ratos Wistar foram induzidos a uma condição de diabetes mellitus e realizada cirurgias de instalação de implantes em tíbia. A escolha deste sítio cirúrgico foi baseada na microarquitetura óssea dos respectivos ossos longos em animais, onde sabe-se que a tíbia é, no rato, o osso que mais se assemelha as características do osso alveolar humano<sup>37</sup>.

A determinação da utilização de grupo controle ou teste foi realizada de forma aleatória, por meio do website <https://www.random.org/>. Neste momento o operador não pôde ser cego devido a topografia visualmente diferente entre os grupos controle e experimental, entretanto, todas as análises foram realizadas por um pesquisador cego.<sup>38</sup>

O número de amostras por grupo foi determinado através da ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA) considerando resultados de desfecho primário em artigos prévios e com metodologia semelhante, desse modo, para determinação da amostra para instalação de implantes, foi utilizada uma diferença entre médias de 144,3, desvio padrão de 41.13 e poder estatístico de 95%, obtendo-se um  $n = 4$  tíbias.<sup>28</sup> Foi adicionada uma tíbia ao respectivo número amostral, devido ao risco de perdas e complicações, o que é sustentado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo  $n = 5$  para implantes, por grupamento de análises (Grupo A – descalcificados e Grupo B – calcificados) e por tempo experimental (14 e 28 dias para grupo A e apenas 28 dias para grupo B), totalizando em 15 tíbias por grupo (ZrAc e PEO-BG).

### **3.1 Texturização de Superfície das Amostras**

#### **3.1.1 Revestimento à Base de Vidro Bioativo por Oxidação por Plasma Eletrolítico**

Para a realização do revestimento de PEO-BG, as amostras (implantes) foram inicialmente limpas por ultrassom com água deionizada (10min), desengorduradas com propanol 70% (10min) e secas com ar quente (250°C). O tratamento por PEO foi realizado utilizando-se uma fonte de alimentação de corrente contínua (Plasma Technology Ltda.), o qual se encontra no Laboratório de Plasma Tecnológico da UNESP de Sorocaba sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz e em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Valentim Barão (UNICAMP), uma sólida e frutífera parceria previamente estabelecida. O tratamento foi realizado com a amostra (ânodo) imerso em uma solução eletrolítica no interior de um reservatório de aço inoxidável (cátodo) com sistema de refrigeração que manteve a temperatura da solução eletrolítica em aproximadamente 20 °C. O suporte da amostra foi projetado para permitir a exposição completa do implante ao eletrólito.

A solução eletrolítica foi preparada utilizando metassilicato de sódio 0,014 M ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; pureza: 98,0%), acetato de cálcio 0,20 M ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca}$ ; pureza: 99,5%), nitrato de sódio 0,50 M ( $\text{NaNO}_3$ ; pureza: 99,5%), e glicerolfosfato de sódio 0,0010 M ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$ ; pureza: 99,0%) como fontes precursoras para os principais elementos bioativos do 45S5-bioglass. Além disso, 0,025 M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   $2\text{H}_2\text{O}$  (pureza: 98,0%) foi usado como agente quelante em todas as soluções eletrolíticas. Os parâmetros de trabalho da PEO foram: tensão anódica pulsada (500 V, 1000 Hz, ciclo de trabalho de 10%) por 420 s. Posteriormente, as amostras tratadas com PEO-BG foram enxaguadas em água destilada, secas ao ar e esterilizadas por autoclave 24 horas antes do procedimento cirúrgico.

### **3.2 Caracterizações de Superfície**

No período baseline, as duas superfícies em questão passaram por avaliações da sobre o método de comprovação da reprodutibilidade da superfície experimental. Para tanto, na maioria das análises foram utilizados discos de titânio com superfície equivalente as utilizadas no estudo e em acordo com o trabalho realizado anteriormente *in vitro*, nas análises qualitativas foi utilizado um  $n = 2$  de

cada grupo (ZrAC; PEO-BG) e nas análises quantitativas um  $n = 4$ , de modo que para todas as análises foram realizadas leituras em no mínimo 3 áreas distintas.

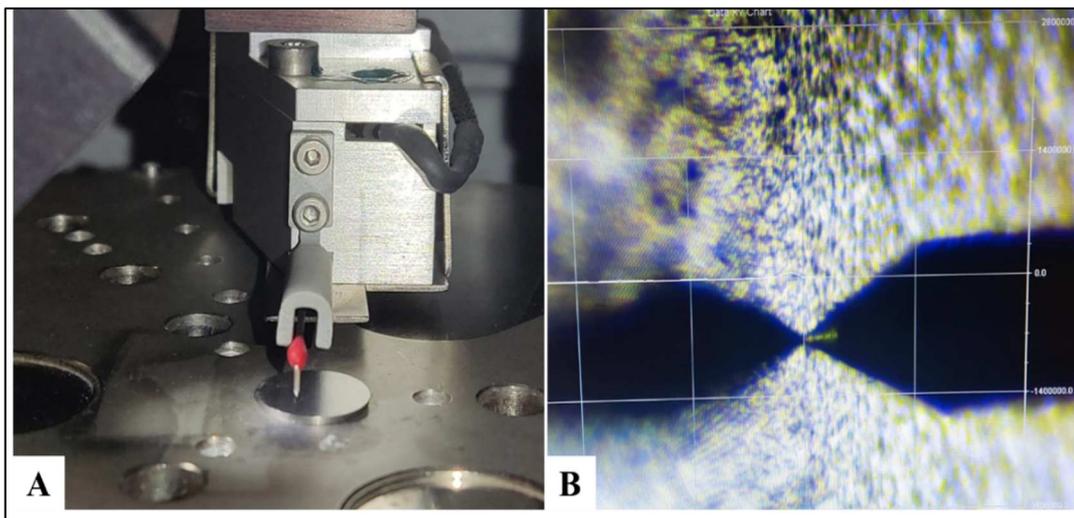
### 3.2.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

O microscópio confocal de varredura a laser 3D (CLSM, Keyence model VK-X200 series) foi utilizado para a obtenção de imagens bidimensionais e tridimensionais, de modo a possibilitar a caracterização qualitativa da topografia da superfície dos espécimes. Para isso, foi utilizada a ampliação de 50 $\times$  e 150 $\times$ . O processamento das imagens e mensuração da área de superfície foi realizado pelo software VK-Analyzer (Keyence v 3.3.0.0).

### 3.2.2 Perfilometria (rugosidade de superfície)

A rugosidade de superfície das amostras foi analisada por meio de um perfilômetro (Dektak 150-d; Veeco) (Figura 1). Os valores de Ra (média aritmética da rugosidade de superfície) foram obtidos utilizando o cut-off de 0,25 mm a uma velocidade de 0,05 mm/s durante 12 s.

**Figura 1 – Demonstração macroscópica (A) e microscópica (B) da ação do perfilômetro durante a análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo.**

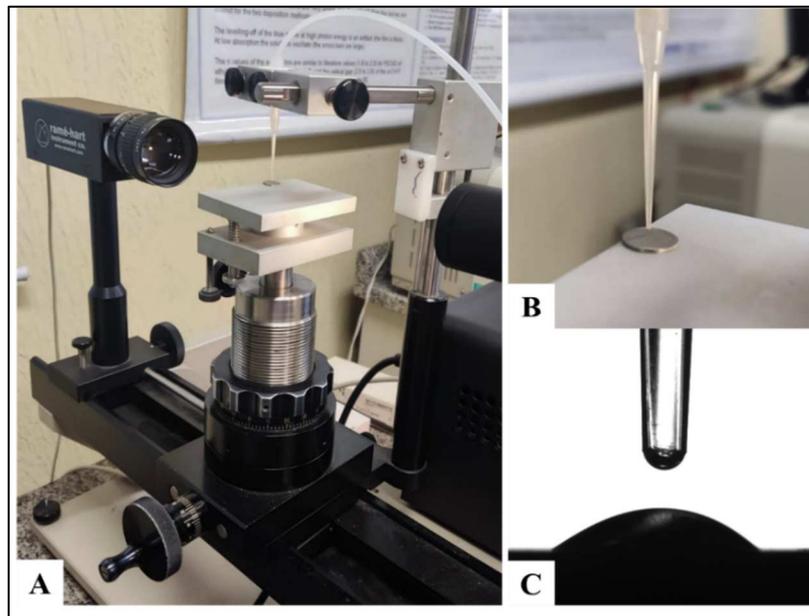


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 3.2.3 Molhabilidade e energia livre de superfície

A energia livre de superfície foi calculada por meio de um goniômetro (Ramé-Hart 10000; Ramé-Hart Instrument Co) utilizando o método da gota séssil (Figura 2). Os grupos foram avaliados quanto ao ângulo de contato com a água (componente polar).

**Figura 2 - Goniômetro utilizado para as análises de molhabilidade e energia livre de superfície (A), sendo demonstrado a ponteira responsável pela aplicação da gota na superfície do disco testado (B) e a imagem capturada pelo programa após a mensuração dos ângulos formados.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva

A análise pela espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada em pequenos volumes, na ordem de  $1 \mu\text{m}^3$  (20). Mapas de cores foram utilizados para investigar a distribuição dos elementos químicos na superfície dos implantes e confirmar a proporção estequiométrica (% atômica) esperada (45% Si, 24.5% Ca, 24.5% Na, 6% P; 5:2:2:1 razão biológica).

### 3.3 Desenho experimental do modelo animal

Antes do início da proposta, o projeto foi enviado para avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e, após obter parecer favorável (Processo FOA nº 0298-2021) o trabalho teve início. Todos os procedimentos realizados seguem as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os guidelines previamente publicados no “Animal Arrive guidelines 2.0”.

Durante todo o experimento os ratos foram mantidos em gaiolas com no máximo 4 animais, num ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgico. Após o procedimento cirúrgico, os animais retornaram para caixas com até 4 animais. Todas as outras condições de ambientação foram mantidas iguais entre todos os ratos.

Para este estudo foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), machos, adultos, com 6 meses de idade, e peso corporal variando de 250 a 300 gramas. Os animais foram fornecidos a partir de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, que por sua vez, foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

O número de amostras por grupo foi determinado através da ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0, como mencionado no início da metodologia, sendo 15 ratos destinados à instalação de implantes (15 tíbias para ZrAC e 15 para PEO-BG).

### 3.3.1 Indução de diabetes mellitus em ratos Wistar

Para indução de diabetes mellitus, os ratos passaram, inicialmente, por um período de jejum durante a noite, com duração entre 14 e 16 horas e em seguida foram coletadas amostras de sangue pelo método da ponta da cauda e as concentrações de glicose no sangue em jejum foram medidas por um sistema automático de monitoramento de glicose no sangue (Accu-Check® Performa; Roche-Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, EUA). Em seguida, os animais foram anestesiados por uma combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Dopalen- Ceva Saúde Animal – Paulínia, São Paulo, Brazil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan – Ceva Saúde Animal – Paulínia, São Paulo, Brazil) e em seguida receberam uma injeção de solução contendo estreptozotocina (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, EUA) dissolvida em uma solução tampão de citrato a 35 mg / kg, na veia peniana (Figura 3).

Seis dias após a indução do diabetes, amostras de sangue foram coletadas para determinar os níveis de glicose sanguínea de todos os animais e os que apresentarem valores acima de 200mg/dL seguiram para as cirurgias de instalação de implantes e confecção de fraturas e osteossíntese. Durante 30 dias, foram realizadas aferições semanais da glicemia de todos os animais e somente após esse período foram realizadas as cirurgias de instalação de implantes em tíbia.

**Figura 3 – Representação clínica do procedimento de aplicação de estreptozotocina via veia peniana.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

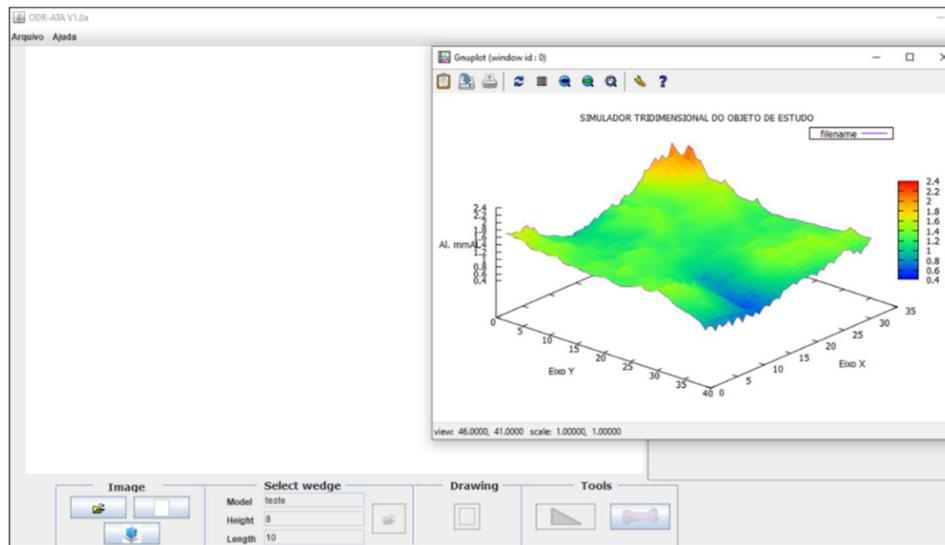
### 3.3.2 Análises comprobatórias da redução da densidade mineral óssea

Densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA Como método auxiliar para comprovação do desenvolvimento de redução da densidade mineral óssea em decorrência da Diabete Mellitus experimentalmente induzida, foi realizada a mensuração da densidade óssea por meio do programa ODR-ATA. Trata-se de um software livre, que tem como objetivo realizar o cálculo da densidade óssea, tendo como base a densitometria radiográfica <sup>39</sup>, utilizando uma cunha de osso bovino como método de comparação com a amostra. Para tanto, nos períodos de eutanásia, foram coletados os fêmures, que não passaram por cirurgia.

Em seguida, foram realizadas radiografias das amostras juntas a uma cunha feita de osso bovino. Com o programa ODR-ATA em execução, foi realizada a seleção da cunha com os dados pré-determinados, denominada de “Cunha Teste”.

Em seguida, a imagem da radiografia digitalizada com a cunha anexada foi selecionada e aberta no programa e como método de calibração, por meio da ferramenta “Drawing”, com o auxílio do mouse, foi feito um esquadramento da imagem da cunha de referência, de modo que o software realizou uma leitura pixel a pixel de todos os tons de cinza, sendo presentes variações de 0 a 255 tons de cinza ao longo da cunha, gerando então um gráfico que representou a curva de densidade radiográfica versus altura da cunha. Finalizada a calibração, a ferramenta “Drawing” foi novamente selecionada, mas dessa vez com o pincel referente ao tecido ósseo, e a região de interesse foi esquadrihada, gerando um valor médio de densidade óssea e um simulador tridimensional da região selecionada (figura 4).

**Figura 4 - Visão geral do programa ODR – ATA, representando as ferramentas no canto inferior e o simulador tridimensional gerado a partir da seleção.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 3.3.3 Análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos)

Além da análise anterior, a comprovação da redução da densidade mineral óssea também contou com a realização de análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos) (MZ-500S; Instrumento Maruto). Para isso, os fêmures, que não foram utilizadas para instalação de implantes, foram utilizadas. As amostras ósseas foram inicialmente posicionadas voltadas para cima em uma plataforma, apoiadas em dois suportes, um anterior e um posterior, permanecendo bem estabilizadas. Em seguida, uma força vertical foi aplicada na região central dos fêmures, com carga de 5mm/min, enquanto curvas de deformação e carga foram traçadas em gráficos com análise de rigidez e força máxima aplicada (Figura 5).

**Figura 5 - Imagem representativa do posicionamento da amostra óssea e da célula de carga utilizada para aplicação de força vertical.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### **3.3.4 Cirurgia de instalação de implantes em tíbia**

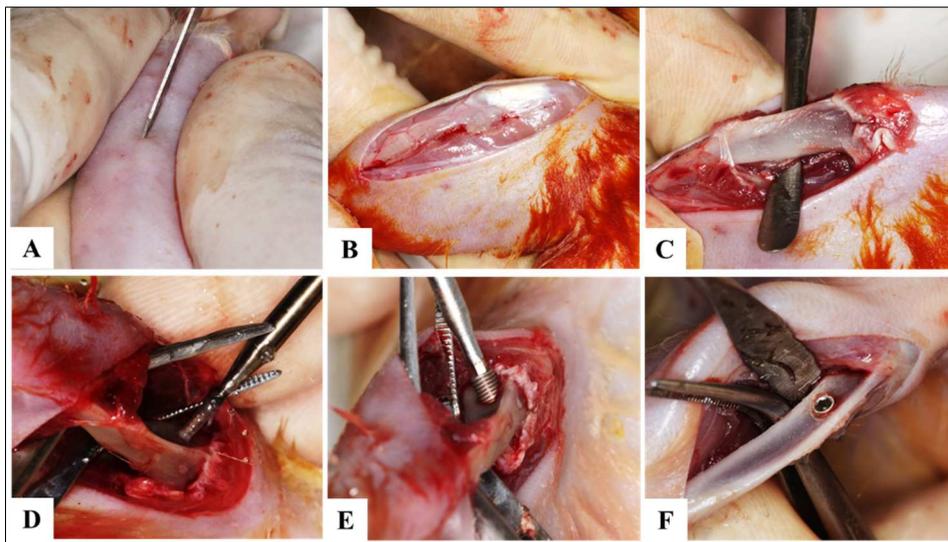
No período de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à jejum, e posteriormente, foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina, em seguida, receberam cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/Kg, Mepiadre 2% 1:100.000<sup>®</sup> - Nova DFL, Taquara, Rio de Janeiro, Brasil) como anestesia local e para hemostasia.

Posteriormente, foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI). Com uma lâmina número 15 foi realizada uma incisão na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo a tíbia. Assim, foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com as seguintes dimensões: diâmetro de 1,6 mm e altura de 4 mm.

Seguindo-se o procedimento cirúrgico, foi realizada fresagem com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 800 rpm, sob irrigação com solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9%, e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany). Cada animal recebeu dois implantes, sendo um em cada metáfise tibial, de modo que cada animal recebeu os dois implantes que foram utilizados neste estudo: com texturização controle (ZrAC) ou teste (PEO-BG).

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon®, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 4-0, Ethicon®, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura 6).

**Figura 6 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial. (B) Exposição da musculatura sobreposta a metáfise tibial. (C) Metáfise tibial exposta. (D) Preparo do leito ósseo. (E) Instalação dos implantes com rosqueamento digital (demonstrado com implante do grupo ZrAC). (F) Representação do posicionamento final do implante bicorticalizado (demonstrado com implante do grupo PEO-BG).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### **3.4 Métodos de análise**

Após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais continuaram no biotério sob os cuidados da equipe. Aos 14 e 28 dias de pós-operatório, os animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina, seguida de solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4 (41), e as tíbias foram encaminhadas para escaneamento por Microtomografia Computadorizada (MICRO-CT) (apenas aos 28 dias) e posteriormente para descalcificação e conseguinte obtenção de lâminas para análise histológica e imunoistoquímica (14 e 28 dias).

## **4 ANÁLISE DE TECIDOS DESCALCIFICADOS – Grupo A**

### **4.1 Análise Histológica**

Nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios, 5 tíbias de cada grupo foram encaminhadas ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento teve início com a descalcificação em EDTA (10%), com trocas semanais da solução, até que se observou ausência de resistência à passagem de uma agulha gengival extra curta, demonstrando que a peça estava descalcificada. Posteriormente, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, foi feita a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina, seguida da obtenção de lâminas com cortes de 5 µm de espessura <sup>42, 46</sup>.

Antes de realizar a inclusão propriamente dita, os implantes foram removidos cuidadosamente das tíbias. Após a microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), para análise observando-se a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade óssea, com avaliação da maturidade e, quantidade de tecido ósseo, assim como presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos.

#### **4.1.1 Avaliação Quantitativa do Tecido Ósseo**

As lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região do defeito ósseo crítico, inicialmente em uma objetiva de 4.0x, que garantiu uma visão ampla do defeito e permitiu a mensuração da área total de tecido ósseo neoformado, a partir do software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA), por meio da ferramenta “Free hands”. A extensão linear de contato osso-implante também foi determinada, pela ferramenta “Straight” do mesmo software.

#### **4.1.2. Avaliação Qualitativa do Tecido Ósseo**

Para observação da maturação e das características do tecido ósseo dos diferentes grupos, foram realizadas fotomicrografias em uma objetiva de 40x. Todas as imagens foram analisadas por um examinador cego e calibrado, evidenciando a região mais central da porção medular como a área de interesse, ressaltando que todos os parâmetros foram calculados de acordo com a Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado <sup>47</sup>.

#### **4.1.3. Avaliação do Perfil Inflamatório**

Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, para cada amostra foram realizadas três fotomicrografias em objetivas de 100x, em diferentes regiões do defeito. Em seguida, no software Image J, será utilizada as ferramentas “Grid” e “Cell Counter Notice”, para localização e contagem propriamente dita das estruturas mencionadas.

### **4.2 Análise Imunoistoquímica**

As lâminas ímpares foram destinadas as reações de imunoistoquímica, onde a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir,

passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários a serem utilizados foram: anti-BMP-2 (BMP-2; sc-137087; Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A), osteoprotegerina (OPG; sc-390518; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL; sc-377079; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteocalcina (OC; sc-365797; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto a indução/formação (BMP-2) remodelação (OPG e RANKL) e mineralização óssea (OC).

O anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas quantitativamente, por meio da contagem das células marcadas <sup>48, 49</sup>. As imagens foram fotomicrografadas em objetiva de 100x, em duas áreas distintas na região do defeito ósseo, e para a contagem de células marcadas foi utilizado o software Image J, com auxílio da ferramenta “Grid” do tipo “Crosses”, com um total de 130 “crosses” por imagem. O controle negativo foi realizado por meio do mesmo procedimento, mas em amostras sem aplicação de anticorpo primário <sup>50,51</sup>.

## **5 ANÁLISE DE TECIDOS CALCIFICADOS – Grupo B**

### **5.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)**

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados, os animais foram eutanasiados com 28 dias de pós-operatório e as peças foram removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70%, para serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. O escaneamento foi realizado por meio do microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 5 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos

raios- X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens adequadas quanto ao posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área de interesse (ROI), que correspondeu a uma região ao redor de todo o implante. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold).

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado <sup>47</sup>, foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo e BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb. Th = espessura do trabeculado ósseo, Tb. SP = separação das trabéculas ósseas e Tb. N = número das trabéculas).

## **5.5 Planejamento Estatístico**

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos através das análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct), Histologia e imunohistoquímica, em função dos grupos experimentais (Grupo ZrAc vs PEO-BG) vs tempo (14/28 dias), estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar se havia homogeneidade dos dados ( $p > 0.05$ ). Assim, um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado, considerando  $p < 0.05$ . Todos os testes foram realizados no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis, San Jose, California, USA).

## 6 RESULTADOS

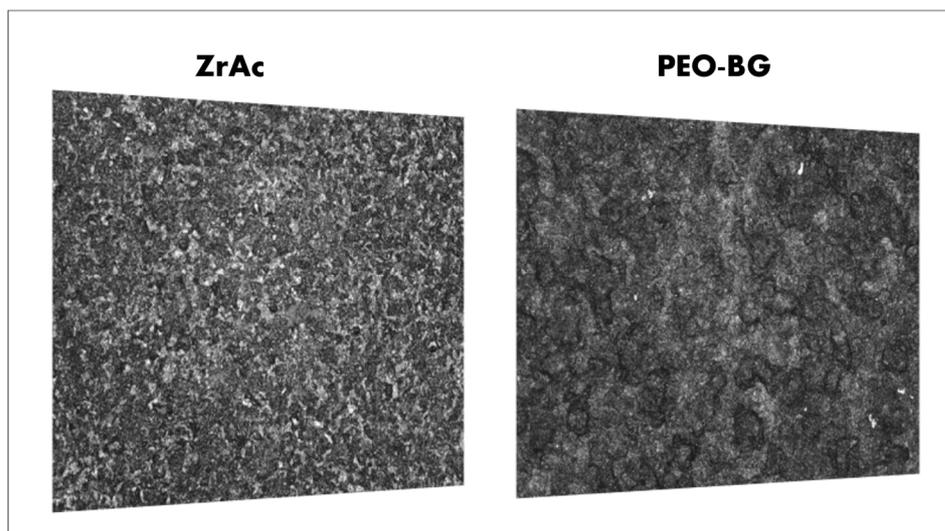
### 6.1 Caracterização topográfica

O estudo examinou duas superfícies de implantes: ZrAc (controle comercial) e PEO-BG (experimental). Uma análise topográfica avaliou a reprodutibilidade da textura e suas implicações na reparação de implantes em animais, usando ZrAc como padrão de comparação.

#### 6.1.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

As imagens bidimensionais (magnitude de 20x) obtidas através da análise de CLSM permitem apresentar a topografia superficial das três superfícies utilizadas neste estudo. Nesse sentido, a superfície ZrAc apresentou poros distribuídos pela superfície com aspecto compatível aos procedimentos de subtração ao qual foi submetida (jateamento de zircônia e duplo ataque ácido). Por sua vez, a superfície produzida por PEO-BG gerou uma superfície com rugosidades distribuídas de forma irregular e com agregados não uniformes (Figura 7).

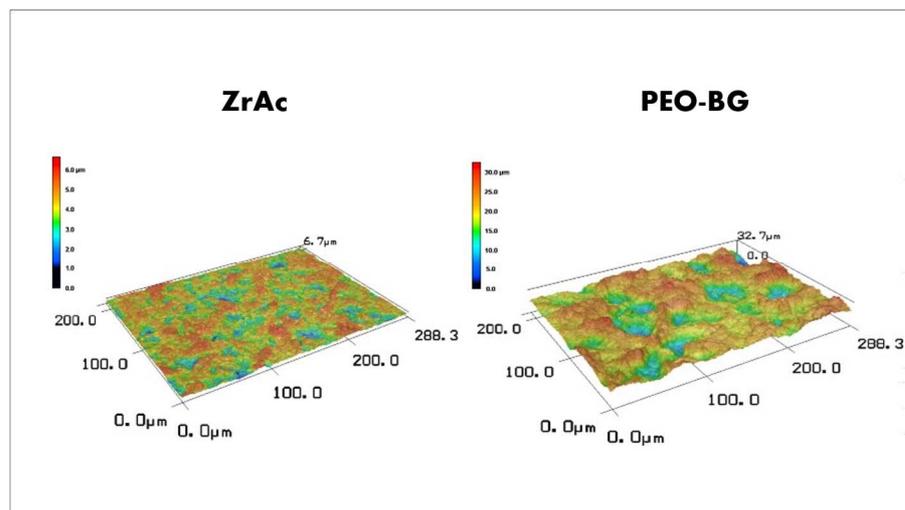
**Figura 7 – Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das superfícies utilizadas no estudo, imagens bidimensionais da análise de CLSM em magnitude de 20x.**



Elaborado pelo autor, 2023.

Na análise tridimensional (magnitude de 50x) foi possível constatar que as regiões de rugosidades de PEO-BG se apresentam como elevações com diferentes alturas entre as regiões de “picos” e “vales”, enquanto ZrAC apresentou, superfície com tendência exponencial ao aplainamento. A análise quantitativa de Área de superfície obtida através de CLSM comprova que PEO-BG apresenta a maior área de superfície entre as amostras testadas ( $<0,001$ ) (Figura 8).

**Figura 8 - Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das superfícies, imagens tridimensionais de CLSM em magnitude de 50x.**

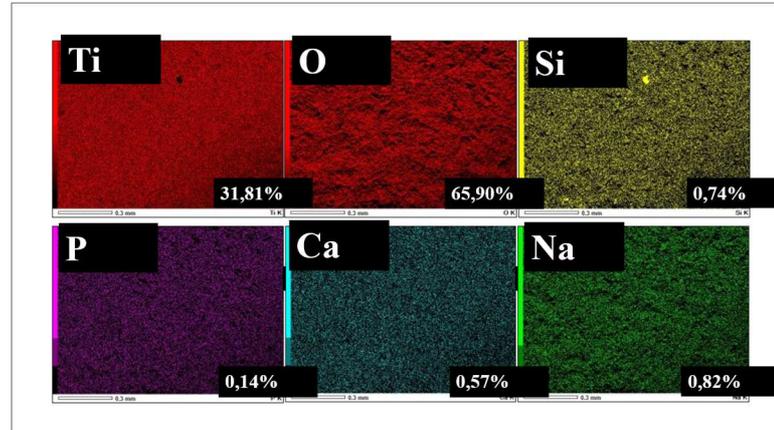


Elaborado pelo autor, 2023.

### 6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Através da análise de EDS foi demonstrado para a superfície PEO-BG componentes com uma proporção correspondente ao que se esperava obter após o tratamento, isto é, com aumento na porcentagem de oxigênio ao titânio e incorporação dos íons utilizados na solução eletrolítica, inclusive o Si (Figura 9).

**Figura 9 – Mapa de cores da proporção atômica dos componentes presentes na superfície.**



Elaborado pelo autor, 2023

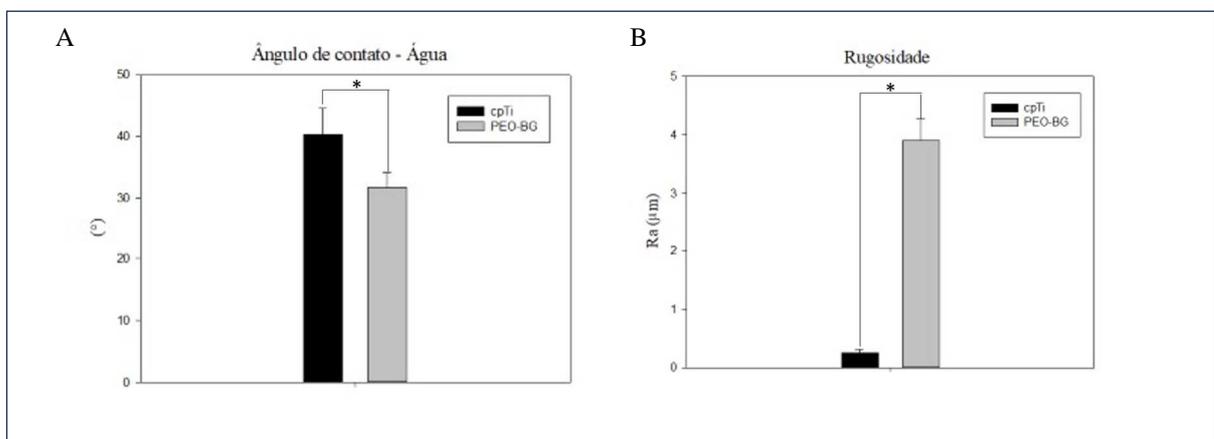
### 6.1.3 Rugosidade de superfície

PEO-BG apresentou valores de rugosidade média ( $R_a$ )=3,897 $\mu$ m significativamente maiores do que ZrAC (0,649 $\mu$ m) (<0,001) (Figura 10 - A).

### 6.1.4 Ângulo de contato – água

Com relação ao ângulo de contato com água, foi observado menor ângulo para o grupo PEO-BG (31.72°), seguido de ZrAc (47.33°) ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 - B).

**Figura 10 - Valores de rugosidade dos grupos experimentais. Representação gráfica dos valores de ângulo de contato com a água. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).**



Elaborado pelo autor, 2023.

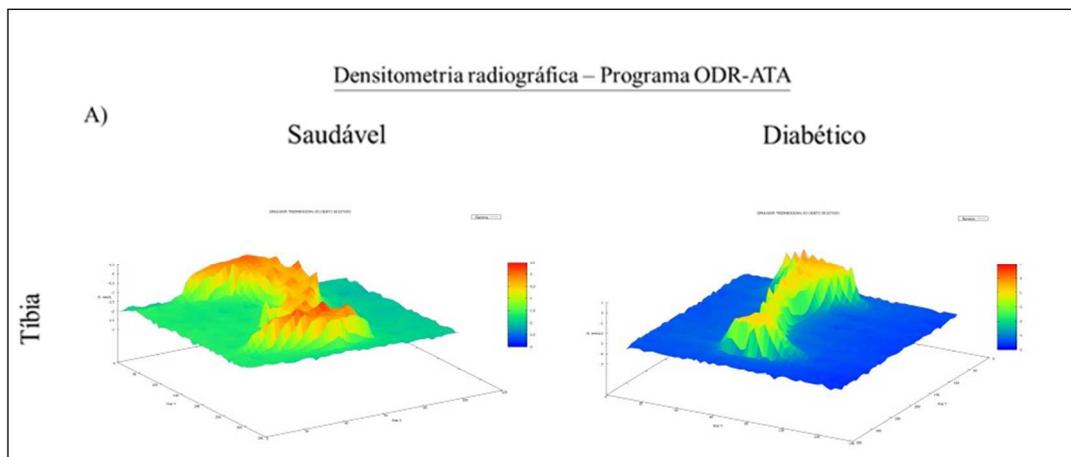
## 6.2 Estudo in vivo

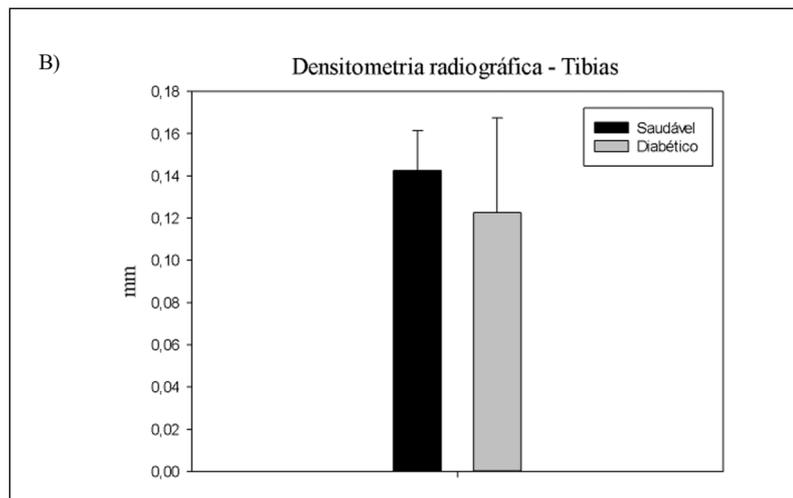
### 6.2.1. Densitometria radiográfica – Programa ODR – ATA

De acordo com a proposta de utilização de modelo animal com baixa densidade mineral óssea através da Diabete Mellitus experimentalmente induzida, uma análise para avaliação da densitometria radiográfica foi performada através do programa ODR-ATA. O programa calcula a densitometria radiográfica através de equações de quinto grau e ainda permite gerar uma imagem tridimensional do tecido ósseo avaliado (Figura 11 - A).

Os resultados obtidos demonstraram discreta superioridade em densidade radiográfica para os animais saudáveis em comparação aos animais experimentalmente diabéticos, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos ( $P = 0,343$ ) (Figura 11 - B).

**Figura 11 - Representação dos resultados obtidos através do programa computacional ODR-ATA. (A) Imagens tridimensionais das amostras ósseas utilizadas para avaliação. (B) Resultados de densitometria radiográfica para as amostras de tíbias.**





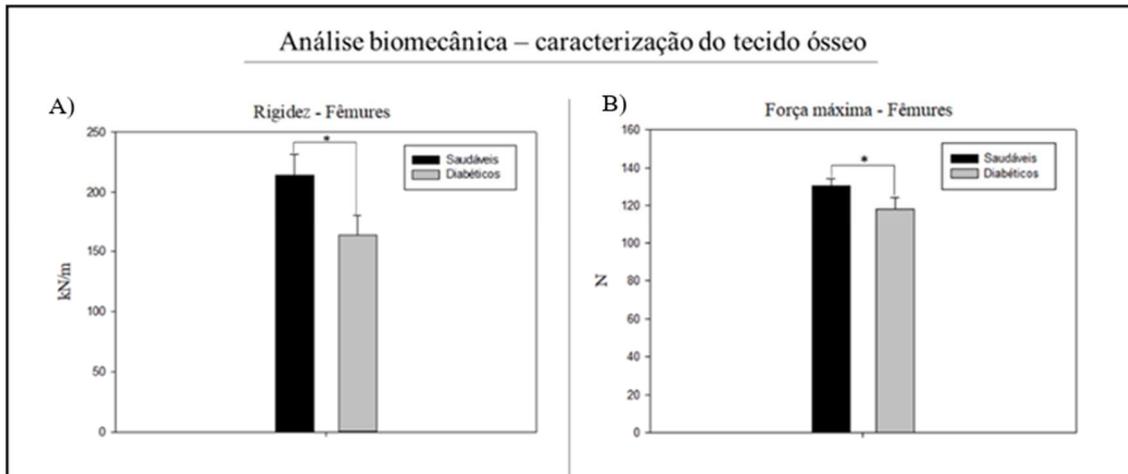
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 6.2.2 Análise comprobatória de redução da DMO – Biomecânica

Ainda como método comprobatório da redução da densidade mineral óssea, foi realizada uma análise adicional de flexão de três pontos, onde foi demonstrado que os animais diabéticos apresentaram menores valores de rigidez óssea (163,19 kN/m) em relação as amostras ósseas (214,45 kN/m) de animais saudáveis, ( $p < 0,05$ ) (Figura 12 – A e B).

Isso também foi observado sobre a força máxima exercida durante os testes, em que os animais diabéticos apresentaram valores de força menores (118,07N), com diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Figura 12 -** Imagens gráficas referentes aos resultados da análise biomecânica de caracterização do tecido ósseo dos animais diabéticos em comparação com animais saudáveis, através da utilização de e fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures. (B) Força máxima para os fêmures.



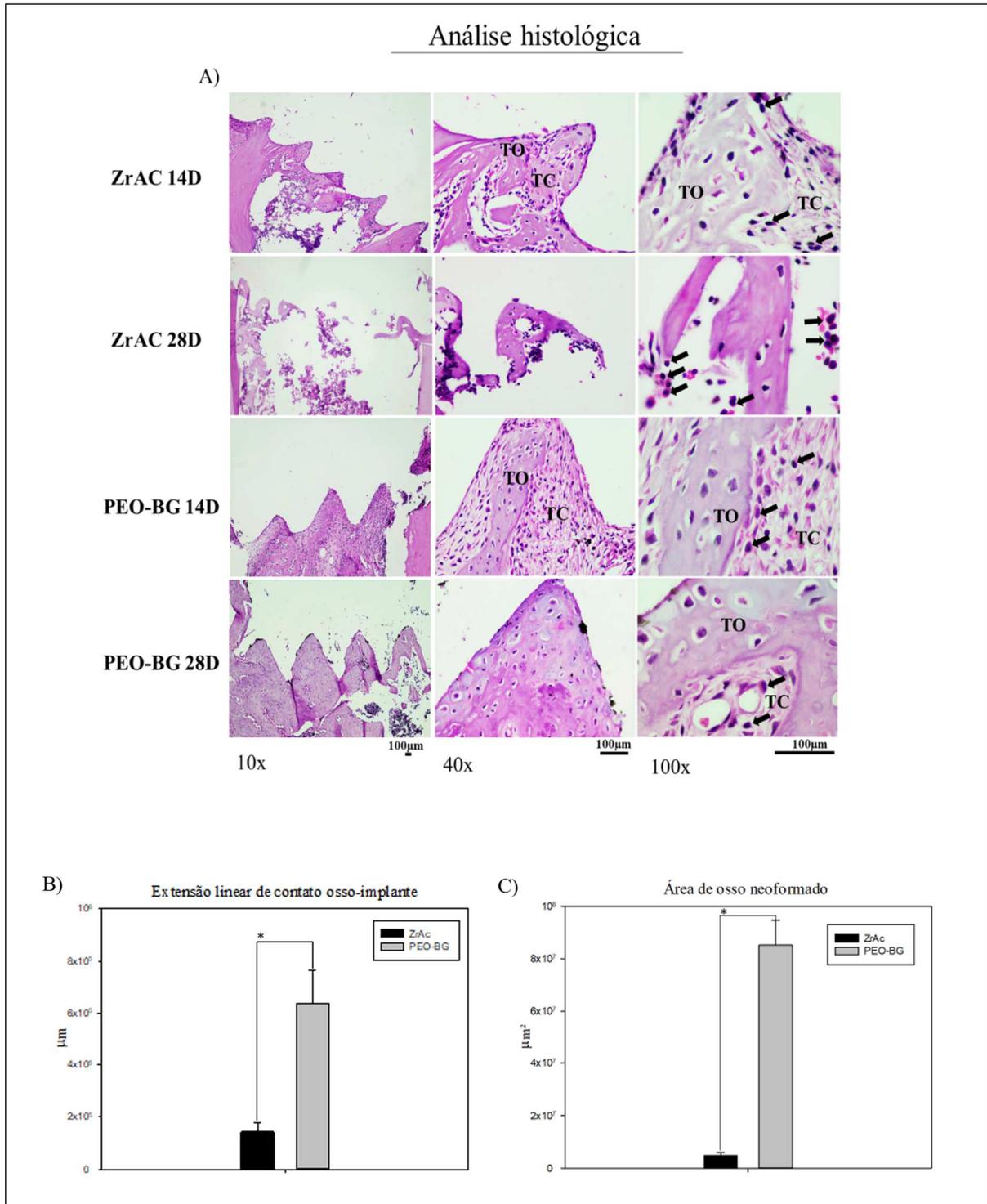
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## 6.3 Estudo De Osseointegração – Análise De Tecidos Descalcificados – Grupo A

### 6.3.1 Análise histológica

A partir das fotomicrografias foi possível observar qualitativamente o tecido ósseo neoformado, em que se constatou um padrão de reparação mais maduro para o grupo PEO-BG em ambos os tempos operatórios, evidenciado pelo espaço periimplantar na região das espiras que estava com maior formação de osso, um tecido mais organizado e menor quantidade de células do tecido conjuntivo (Figura 13 – A). Os valores de área de osso neoformado foram significativamente maiores para PEO-BG em comparação a ZrAc ( $P = 0,002$ ). O mesmo ocorreu com a extensão linear de contato osso-implante, se apresentando superior para o grupo experimental ( $P < 0,001$ ) (Figura 13 – B e C).

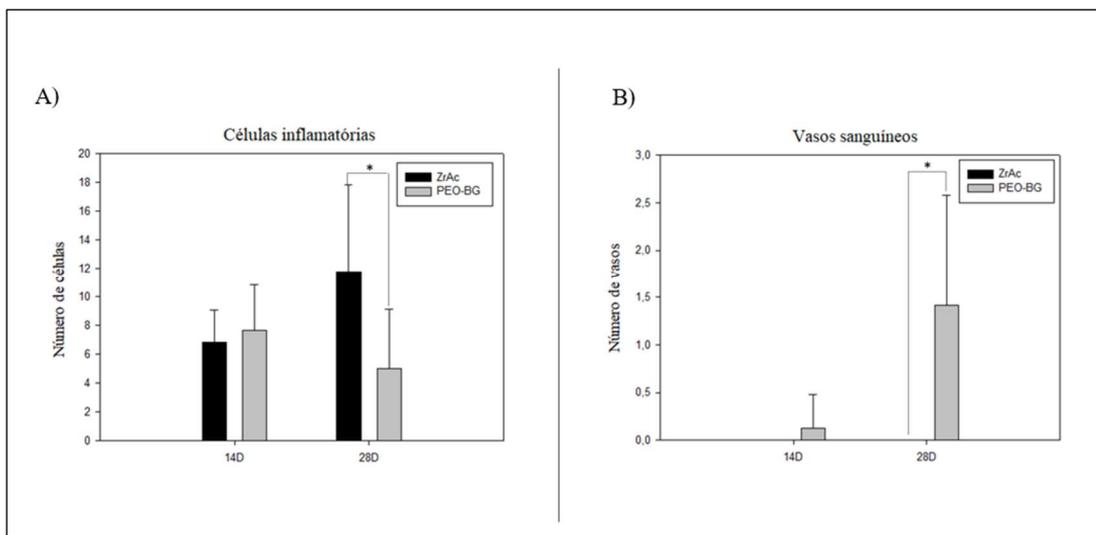
Figura 13 – Imagens referentes a análise histológica das amostras de implantes instalados em tíbias. (A) Fotomicrografias representativas em magnitudes de 10x, 40x e 100x, respectivamente. (B) Representação gráfica da extensão linear osso-implante. (C) Representação gráfica da área de osso neoformado. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com relação ao perfil inflamatório, que teve como ênfase a contagem de linfócitos e de vasos sanguíneos, foi observado um padrão de inflamação similar para ambos os grupos aos 14 dias ( $p > 0,05$ ). Entretanto, aos 28 dias, o grupo ZrAC apresentou maiores valores na contagem de células inflamatórias e menor quantidade de vasos sanguíneos, em relação ao grupo PEO-BG ( $p < 0,05$ ) (Figura 14 – A e B).

**Figura 14 – (A) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (B) Representação gráfica de contagem de vasos sanguíneos. As setas pretas demonstram o padrão de célula que foi considerada na contagem (linfócitos). A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).**



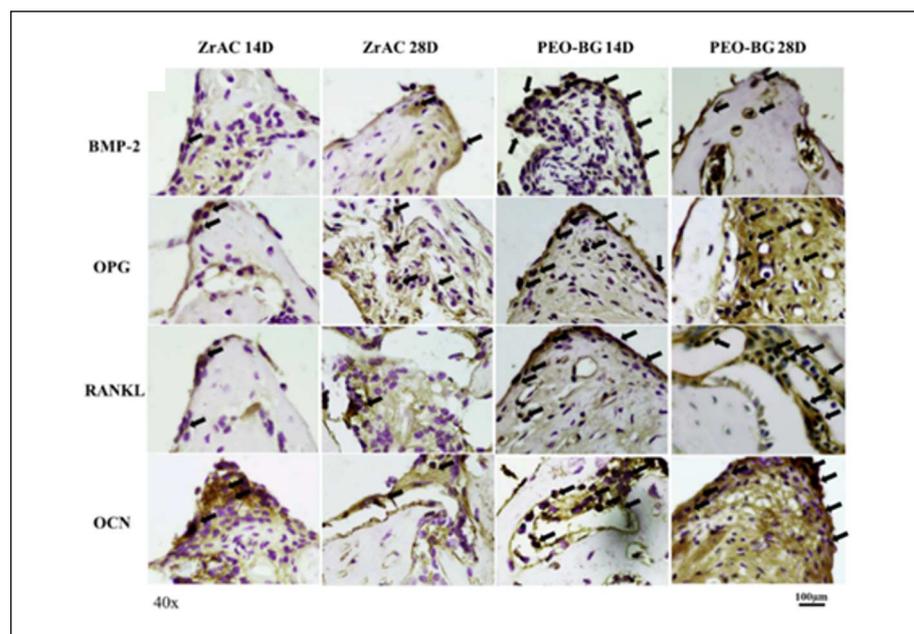
Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2023.

### 6.3.2 Análise imunoistoquímica

A partir da análise imunoistoquímica foi observado que para ambos os implantes utilizados (ZrAC e PEO-BG) houve expressão, mesmo que leve para algumas amostras, de todas as proteínas utilizadas neste estudo, isto é, BMP-2, OPG, RANKL e OCN (Figura 15).

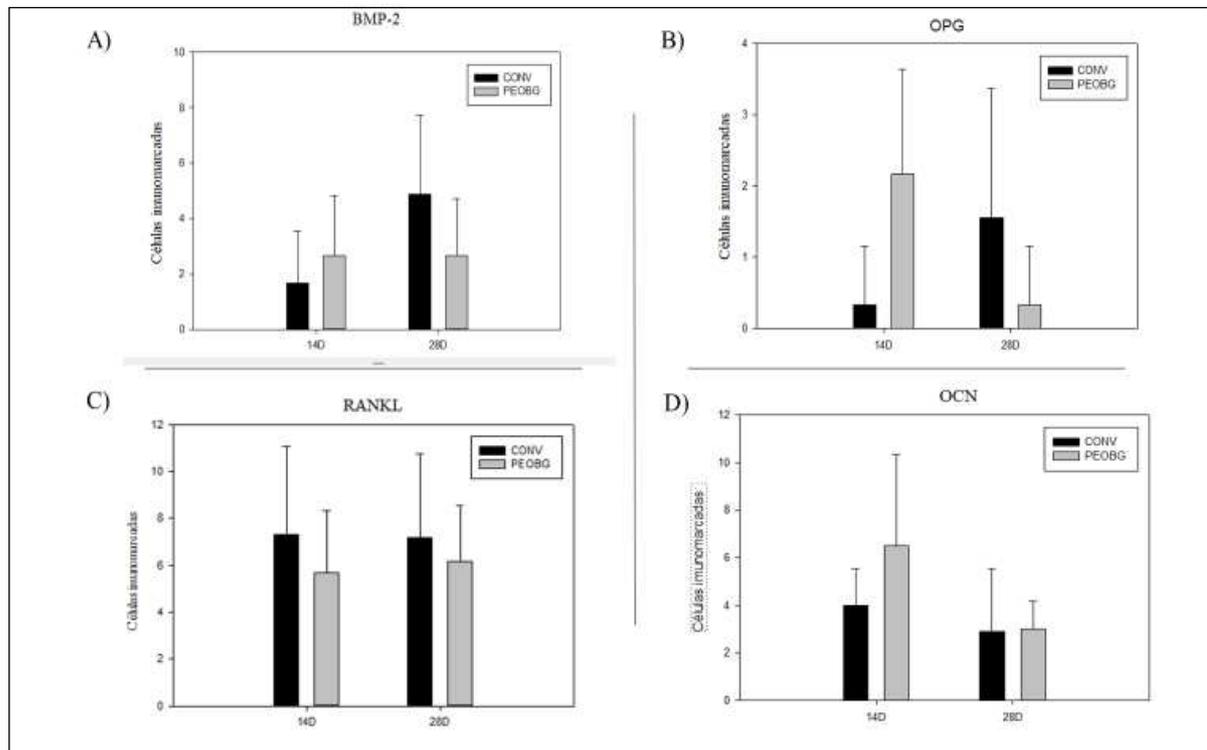
Para BMP-2 houve maior imunomarcção para o grupo PEO-BG em ambos os tempos pós-operatórios, mas principalmente aos 14 dias, com diferença significativamente estatística ( $p=0,048$ ) (Figura 16-A). A expressão de OPG também foi significativamente maior para PEO-BG em ambos os tempos quando comparado a ZrAC ( $p<0,05$ ) (Figura 16-B). Quanto a RANKL, a expressão também foi significativamente mais marcada para PEO-BG ( $p<0,05$ ) aos 14 e 28 dias de pós-operatório (Figura 16-C). Já para OCN, aos 14 dias houve maior marcação para o grupo ZrAC, com diferença significativamente estatística ( $p=0,017$ ) o que se inverteu aos 28 dias e PEO-BG demonstrou maior marcação, entretanto sem significância (Figura 16-D).

**Figura 15 - Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcção das respectivas proteínas.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2023.

**Figura 16 - (A) Valores de imunomarcção de BMP-2. (B) Valores de imunomarcção de OPG. (C) Valores de imunomarcção de RANKL. (D) Valores de imunomarcção de OCN. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).**



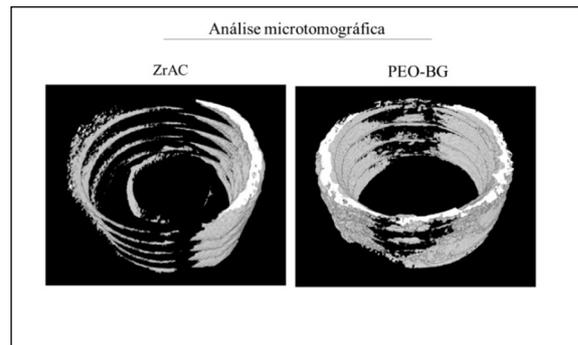
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## 6.4 Análise De Tecidos Calcificados – Grupo B

### 6.4.1 Análise microtomográfica

A partir da análise microtomográfica foi possível realizar a caracterização microestrutural do tecido ósseo ao redor dos implantes ZrAc e PEO-BG aos 28 dias de pós-operatório. Já na imagem tridimensional, utilizada como meio de representação dos resultados, é demonstrado que PEO-BG levou a formação de espiras mais robustas e com distribuição mais homogênea ao redor de todo o implante. Enquanto, ZrAc apresentou espiras mais delgadas na maior parte do implante com maior dificuldade de osseointegração (Figura 17).

**Figura 17 – Imagens Referentes a análise microtomográfica, representação tridimensional da área óssea ao redor do implante.**

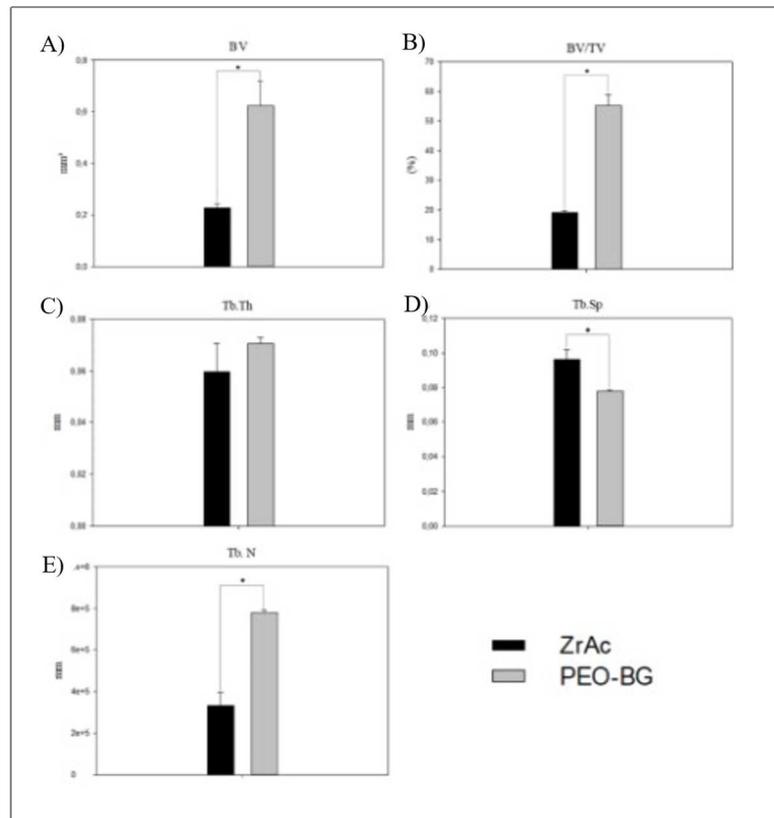


Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2023.

Com relação aos parâmetros de quantidade do tecido ósseo, volume ósseo (BV) e a porcentagem de volume ósseo (BV/TV) apresentaram valores significativamente maiores para PEO-BG ( $P = <0,001$ ) (Figura 18 – A e B).

Já no que diz respeito aos parâmetros de qualidade do tecido ósseo, a espessura do trabeculado ósseo (Tb. Th) foi bastante similar entre os grupos (Figura 18 – C). A separação das trabéculas ósseas (Tb. Sp) foi maior para ZrAC ( $P = 0,029$ ) (Figura 18 – D). Já o número de trabéculas (Tb. N) foi superior para PEO-BG ( $P = 0,029$ ) (Figura 18 – E).

**Figura 18 – (A) Representação gráfica dos valores de volume ósseo (BV). (B) Representação gráfica da porcentagem de volume ósseo (BV/TV). (C) Representação gráfica dos valores de espessura do trabeculado ósseo (Tb. Th). (D) Representação gráfica de separação das trabéculas ósseas. (E) Representação gráfica do número de trabéculas (Tb. N). A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (\*).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## 7 DISCUSSÃO

Com base nos resultados alcançados nesse estudo *in vivo*, que teve como objetivo examinar os impactos de um novo revestimento de oxidação por plasma eletrolítico à base de vidro bioativo (PEO-BG), foram identificadas algumas características osteoindutoras associadas à superfície, unindo os efeitos benéficos da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) com as propriedades vantajosas do vidro bioativo (BG).

Marques e colaboradores<sup>52,53</sup> constataram, por meio de um estudo *in vitro*, os desfechos da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), no qual foi evidenciada a habilidade do PEO em estimular respostas biológicas e mecânicas aprimoradas e melhorias relacionadas à corrosão de materiais à base de titânio, com especial ênfase nos implantes osseointegrados. O vidro bioativo, conhecido como biovidro,

suscitou interesse na área de bioengenharia de tecidos e regeneração óssea devido à sua composição rica em cálcio e fosfato, elementos essenciais para a formação da hidroxiapatita óssea. Quando exposto a fluidos corporais, o biovidro promove a criação de uma superfície propícia ao desenvolvimento de cristais de hidroxiapatita, o que é altamente vantajoso para a interação com osteoblastos<sup>54</sup>. O biovidro tem sido amplamente estudado como revestimento de cerâmicas, produção de arquiteturas em diversas superfícies, associações com outros materiais e outras aplicações na engenharia tecidual.<sup>55, 57</sup> Acredita-se que ele seja eficaz em melhorar a revascularização, a adesão de osteoblastos, a atividade enzimática e a diferenciação de células-tronco mesenquimais.<sup>58</sup>

A associação dessas importantes propriedades do biovidro com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), pioneiramente realizada por Costa e colaboradores<sup>36</sup>, suscitou grandes expectativas em relação à nova superfície. Através do estudo *in vitro* revelaram uma topografia altamente hidrofílica, propriedades mecânicas e tribológicas aprimoradas, maior resistência à corrosão, modulação positiva de biofilmes polimicrobianos, maior capacidade de adsorção de proteínas plasmáticas e ausência de efeitos citotóxicos em células humanas. Todas essas características levaram à hipótese de que o PEO-BG apresenta potencial como superfície osteoindutora, especialmente devido à sua alta afinidade pelos componentes minerais do tecido ósseo e sua otimizada atração celular.

Este estudo é de grande importância ao apresentar, pela primeira vez, as respostas fisiológicas do organismo em um modelo animal, à topografia gerada pelo PEO-BG. A caracterização topográfica inicial foi fundamental para demonstrar a reprodutibilidade da superfície e suas vantagens microestruturais em relação a outras superfícies utilizadas. Através da Espectroscopia de Energia Dispersiva, foi confirmada a efetiva incorporação dos elementos do biovidro nos implantes utilizados.

A superfície PEO-BG apresentou uma topografia distinta, com rugosidades expressivas distribuídas homoganeamente em toda a sua extensão. Os valores de

área de superfície são significativamente maiores em comparação com outras amostras (cp Ti e ZrAc). Além disso, a superfície PEO-BG demonstrou maior molhabilidade, favorecendo a adesão celular e a distribuição de fluidos teciduais. Essas características permitem uma melhor interação com elementos essenciais para o reparo ósseo, como sangue, proteínas, citocinas e células osteogênicas.<sup>62</sup>

A busca por melhorias no processo de reparo ósseo é motivada, principalmente, pelas limitações clínicas no tratamento de pacientes com condições sistêmicas adversas, como é o caso da osteoporose e a diabetes mellitus.<sup>15,19</sup> Por esse motivo, optou-se por induzir experimentalmente a diabetes mellitus em um modelo animal, a fim de simular uma situação crítica e avaliar se a superfície experimental seria capaz de promover o reparo ósseo mesmo em condições de redução da densidade mineral óssea decorrente da diabetes.

Por meio da análise histológica, um dos principais resultados deste estudo, foi a observação da área de osso neoformado na região periimplantar, a qual se mostrou significativamente maior no grupo PEO-BG. Nesse grupo, constatou-se uma notável tentativa de preenchimento dos espaços entre as espiras dos implantes, resultando em um tecido ósseo mais estruturado e com uma extensão linear maior de contato osso-implante. Essas propriedades sugerem que a osseointegração foi otimizada mesmo em um período estimado de 2,8 meses de pós-operatório.

Na região periimplantar das amostras de PEO-BG, foi observado um tecido organizado com menores quantidades de células inflamatórias, bem como maior presença de osteoblastos e vasos sanguíneos, indicando, assim, uma maior maturidade óssea em comparação com os implantes ZrAc. Estes últimos demonstraram uma neoformação óssea inferior, caracterizada por espiras menores e tecido desorganizado. Adicionalmente, a avaliação do perfil inflamatório evidenciou que ZrAc apresentou maiores infiltrados inflamatórios, o que pode atuar como fator limitante para o reparo ósseo.

Trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa já haviam comprovado os benefícios da oxidação por plasma eletrolítico com a incorporação de cálcio e fosfato no reparo ósseo periimplantar e na consolidação óssea de fraturas femorais em animais osteoporóticos. Essa abordagem se mostrou capaz de acelerar e otimizar o reparo ósseo, conduzindo-o a uma condição próxima à observada em animais saudáveis, ou seja, sem alterações na densidade mineral óssea <sup>20, 28, 29</sup>.

A análise histológica foi corroborada pelos resultados de imunomarcção das proteínas investigadas. O grupo PEO-BG apresentou uma expressão significativamente maior da proteína BMP-2 aos 14 dias, indicando maior atividade nos estágios iniciais da neoformação óssea e uma maior interface de recrutamento de osteoblastos. Paralelamente, as proteínas RANKL e OPG revelaram valores substancialmente maiores para o grupo PEO-BG em comparação com o grupo ZrAc, sugerindo um maior turnover ósseo e impacto positivo na renovação tecidual e deposição de matriz óssea. Quanto à proteína OCN, verificou-se que aos 14 dias a expressão foi significativamente maior para o grupo ZrAc, mas aos 28 dias houve uma inversão, com o grupo PEO-BG mostrando uma expressão ligeiramente superior. Esses resultados sugerem que o grupo ZrAc apresentou uma imunomarcção superior aos 14 dias devido a uma mineralização mais tardia do tecido ósseo, enquanto o grupo PEO-BG estava em uma fase mais avançada de neoformação óssea.

A análise microtomográfica foi fundamental para complementar a avaliação histológica, revelando que o grupo PEO-BG apresentou resultados significativamente maiores em volume e porcentagem de volume ósseo após 28 dias pós-operatórios. Além disso, a representação tridimensional mostrou espiras mais robustas e distribuição homogênea ao redor do implante para o grupo PEO-BG. O tecido ósseo neoformado nesse grupo também exibiu maior número de trabéculas ósseas, enquanto o grupo ZrAc teve trabéculas mais separadas. A espessura do trabeculado ósseo foi similar em ambos os grupos. Esses resultados reforçam a

eficácia da superfície PEO-BG na promoção de um reparo ósseo otimizado, o que a torna uma opção promissora em comparação a outras superfícies de implantes disponíveis.

Essas descobertas reforçam a relevância do revestimento de oxidação por plasma eletrolítico à base de vidro bioativo (PEO-BG) como uma superfície potencialmente osteoindutora, com benefícios importantes na interação com o tecido ósseo e na otimização do reparo ósseo. Além disso, os dados sugerem que a técnica PEO-BG pode ter implicações clínicas significativas, especialmente em situações desafiadoras de reparação óssea. A abordagem inovadora dessa superfície pode contribuir para melhorias no tratamento de pacientes com condições sistêmicas adversas, como osteoporose e diabetes mellitus.

As descobertas deste estudo representam uma contribuição valiosa para a área de engenharia tecidual e podem ter impacto significativo na prática clínica relacionada à osseointegração e ao reparo ósseo. Futuros estudos, considerando diferentes tempos de carregamento de implantes e modelos ósseos específicos, são fundamentais para aprofundar a compreensão dos efeitos da superfície PEO-BG em diversas condições clínicas e validar seu potencial para acelerar e otimizar a osseointegração em pacientes com baixa densidade mineral óssea.

A aplicação da superfície PEO-BG, em comparação com a superfície ZrAc, otimiza o reparo ósseo na região periimplantar, tornando-se um aliado valioso para a osseointegração, especialmente em casos de reparação desafiadores. É importante ressaltar que pacientes diabéticos frequentemente enfrentam falhas nos implantes, o que pode resultar em reintervenções cirúrgicas, maior morbidade e custos elevados.

Neste contexto, apesar das limitações deste estudo pré-clínico, é possível inferir que a técnica de PEO-BG apresenta facilidade em sua realização, além de baixo custo a longo prazo e resistência à deterioração após a esterilização por autoclave. Além disso, ela demonstra um promissor potencial de aplicação clínica,

podendo contribuir para a redução das falhas de implantes e aumentar as taxas de sucesso nas reabilitações orais.

Os autores, acreditam que futuros estudos com diferentes períodos de carregamento de implantes em modelo ósseo de baixa densidade mineral seriam relevantes para investigar e validar a capacidade de aceleração da osseointegração em implantes revestidos por PEO-BG.

## **8 CONCLUSÃO**

A partir desta investigação *in vivo*, foi possível concluir que o revestimento de oxidação por plasma eletrolítico à base de vidro bioativo apresentou potencial osteoindutivo, o que otimizou de forma significativa os parâmetros do reparo ósseo periimplantar na tíbia de ratos com diabetes mellitus experimentalmente induzida.

## REFERÊNCIAS

1. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015 Jan;70:93-101. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.033. Epub 2014 Aug 2. PMID: 25093266.
2. Snauwaert K, Duyck J, van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. Time dependent failure rate and marginal bone loss of implant supported prostheses: a 15-year follow-up study. *Clin Oral Investig*. 2000 Mar;4(1):13-20. doi: 10.1007/s007840050107. PMID: 11218510.
3. Chukwulebe S, Hogrefe C. The Diagnosis and Management of Facial Bone Fractures. *Emerg Med Clin North Am*. 2019 Feb;37(1):137-151. doi: 10.1016/j.emc.2018.09.012. PMID: 30454777.
4. Ayoub A, Al-Fotawei R. Biomaterials in the Reconstruction of the Oral and Maxillofacial Region. *Front Oral Biol*. 2015;17:101-14. doi: 10.1159/000381700. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26201280.
5. Liedert A, Kaspar D, Augat P, et al. Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Moscow: Academia; 2005. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7494/>
6. Morgenstern M, Erichsen C, von Rüden C, Metsemakers WJ, Kates SL, Moriarty TF, Hungerer S. Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients. *Injury*. 2016 Jul;47(7):1427-34. doi: 10.1016/j.injury.2016.04.027. Epub 2016 May 2. PMID: 27178769.
7. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Jakob M, Balmelli C, Schaefer DJ, Weisser M, Elzi L, Battegay M, Widmer AF. Validation of a treatment algorithm for orthopaedic implant-related infections with device-retention-results from a prospective observational cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2016 May;22(5):457.e1-9. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.004. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26806134.
8. Manchanda K, Nakonezny P, Sathy AK, Sanders DT, Starr AJ, Wukich DK. A systematic review of ankle fracture treatment modalities in diabetic patients. *J Clin Orthop Trauma*. 2020 Dec 13;16:7-15. doi: 10.1016/j.jcot.2020.12.013. Erratum in: *J Clin Orthop Trauma*. 2021 Aug 05;21:101558. PMID: 33717936; PMCID: PMC7920114.
9. Kempegowda H, Richard R, Borade A, Tawari A, Graham J, Suk M, Howenstein A, Kubiak EN, Sotomayor VR, Koval K, Liporace FA, Tejwani N, Horwitz DS. Obesity Is Associated With High Perioperative Complications Among Surgically Treated Intertrochanteric Fracture of the Femur. *J Orthop Trauma*. 2017 Jul;31(7):352-357. doi: 10.1097/BOT.0000000000000825. PMID: 28323791.

10. Lang LA, Hansen SE, Olvera N, Teich S. A comparison of implant complications and failures between the maxilla and the mandible. *J Prosthet Dent.* 2019 Apr;121(4):611-617. doi: 10.1016/j.prosdent.2018.08.002. Epub 2018 Dec 29. PMID: 30600092.
11. Chappuis V, Avila-Ortiz G, Araújo MG, Monje A. Medication-related dental implant failure: Systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Oct;29 Suppl 16:55-68. doi: 10.1111/clr.13137. PMID: 30328197.
12. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 Jan 31;8(3):133-43. doi: 10.1038/nrrheum.2012.1. PMID: 22293759.
13. Karlamangla AS, Burnett-Bowie SM, Crandall CJ. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018 Dec;45(4):695-708. doi: 10.1016/j.ogc.2018.07.012. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30401551; PMCID: PMC6226267.
14. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Sep;44(3):517-30. doi: 10.1016/j.ecl.2015.05.002. PMID: 26316240.
15. Murray CE, Coleman CM. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 30;20(19):4873. doi: 10.3390/ijms20194873. PMID: 31575077; PMCID: PMC6801685.
16. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2015 Oct;13(5):327-35. doi: 10.1007/s11914-015-0286-8. PMID: 26254939; PMCID: PMC4692363.
17. Martins J.M., Aranha P. Abnormal mineral metabolism in diabetic patients – relevance to micro- and macrovascular disease and to bone metabolic disorder. *J Diabetes Treat.* 2018;1:JDBT-142.
18. Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):394-405. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.020. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24076073.
19. Kanazawa I, Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern Med.* 2018 Oct 1;57(19):2773-2785. doi: 10.2169/internalmedicine.0905-18. Epub 2018 May 18. PMID: 29780142; PMCID: PMC6207820.
20. Momesso GAC, Polo TOB, da Silva WPP, Barbosa S, Freitas GP, Lopes HB, Rosa AL, Cordeiro JM, Toro LF, Chiba FY, Matsushita DH, Louzada MJQ, da Cruz NC, Barão VAR, Faverani LP. Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021 Jan;120:111775. doi: 10.1016/j.msec.2020.111775. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33545905.

21. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, Del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2018 Nov;9(4):e12349. doi: 10.1111/jicd.12349. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29971928.
22. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *Biomed Res Int*. 2015;2015:791725. doi: 10.1155/2015/791725. Epub 2015 Sep 7. PMID: 26436097; PMCID: PMC4575991.
23. Oliveira NT, Guastaldi FP, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, Iezzi G. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Jun;15(3):427-37. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00354.x. Epub 2011 May 9. PMID: 21554530.
24. Hatamleh MM, Wu X, Alnazzawi A, Watson J, Watts D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dent Mater*. 2018 Apr;34(4):676-683. doi: 10.1016/j.dental.2018.01.016. PMID: 29398110.
25. De Bruyn H, Christiaens V, Doornewaard R, Jacobsson M, Cosyn J, Jacquet W, Vervaeke S. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontol 2000*. 2017 Feb;73(1):218-227. doi: 10.1111/prd.12177. PMID: 28000269.
26. Walsh FC, Low CTJ, Wood RJK, et al. Plasmaelectrolytic oxidation (PEO) for production of ano-dised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Trans Inst Met Finish*. 2013;87(3):122–135.
27. Akatsu T, Yamada Y, Hoshikawa Y, Onoki T, Shinoda Y, Wakai F. Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Dec 1;33(8):4871-5. doi: 10.1016/j.msec.2013.08.003. Epub 2013 Aug 14. PMID: 24094199.
28. Polo TOB, Silva WPP, Momesso GAC, Lima-Neto TJ, Barbosa S, Cordeiro JM, Hassumi JS, da Cruz NC, Okamoto R, Barão VAR, Faverani LP. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: an in vivo study. *Sci Rep*. 2020 Jun 19;10(1):10000. doi: 10.1038/s41598-020-65289-2. Erratum in: *Sci Rep*. 2020 Oct 28;10(1):18821. PMID: 32561767; PMCID: PMC7305204.
29. Polo TOB, Momesso GAC, Silva WPP, Santos AMS, Fonseca-Santos JM, da Cruz NC, Barão VAR, Garcia VG, Theodoro LH, Faverani LP. Is an anodizing coating associated to the photobiomodulation able to optimize bone healing in ovariectomized animal model? *J Photochem Photobiol B*. 2021 Apr;217:112167. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112167. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33667733.
30. Momesso GAC, Santos AMS, Fonseca E Santos JM, da Cruz NC, Okamoto R, Barão VAR, Siroma RS, Shibli JA, Faverani LP. Comparison between Plasma Electrolytic Oxidation Coating and Sandblasted Acid-Etched Surface Treatment: Histometric, Tomographic, and

Expression Levels of Osteoclastogenic Factors in Osteoporotic Rats. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 1;13(7):1604. doi: 10.3390/ma13071604. PMID: 32244631; PMCID: PMC7178360.

31. Echeverry-Rendón M, Galvis O, Aguirre R, Robledo S, Castaño JG, Echeverría F. Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Sep 27;28(11):169. doi: 10.1007/s10856-017-5972-x. PMID: 28956201.
32. He J, Feng W, Zhao BH, Zhang W, Lin Z. In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 March/April;33(2):298–310. doi: 10.11607/jomi.5764. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29420672.
33. Klein M, Kuhn Y, Woelke E, Linde T, Ptock C, Kopp A, Bletek T, Schmitz-Rode T, Steinseifer U, Arens J, Clauser JC. In vitro study on the hemocompatibility of plasma electrolytic oxidation coatings on titanium substrates. *Artif Organs*. 2020 Apr;44(4):419-427. doi: 10.1111/aor.13592. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31660616.
34. Zhou K, Xie F, Wu X, Wang S. Fabrication of High Temperature Oxidation Resistance Nanocomposite Coatings on PEO Treated TC21 Alloy. *Materials (Basel)*. 2019 Dec 18;13(1):11. doi: 10.3390/ma13010011. PMID: 31861393; PMCID: PMC6982117.
35. Laurindo CA, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Apr 1;37:223-31. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.006. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24582243.
36. Costa RC, Souza JGS, Cordeiro JM, Bertolini M, de Avila ED, Landers R, Rangel EC, Fortulan CA, Retamal-Valdes B, da Cruz NC, Feres M, Barão VAR. Synthesis of bioactive glass-based coating by plasma electrolytic oxidation: Untangling a new deposition pathway toward titanium implant surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 2020 Nov 1;579:680-698. doi: 10.1016/j.jcis.2020.06.102. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32652323.
37. Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 May-Jun;25(3):516-24. PMID: 20556250.
38. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol*. 2020 Aug;177(16):3617-3624. doi: 10.1111/bph.15193. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32662519; PMCID: PMC7393194.
39. OLIVEIRA, M.T. Programa computacional ODR-ATA para densitometria óssea baseado na densitometria radiografica. 2014.

40. Silva AV da, Volpon JB. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta ortop bras* [Internet]. 2004Jan;12(1):22–31. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1413-78522004000100004>
41. Fan GY, Cherng JH, Chang SJ, Poongodi R, Wang CH, Wang YW, Wang YH, Liu CC, Meng E. Severe Burn Injury in a Swine Model for Clinical Dressing Assessment. *J Vis Exp*. 2018 Nov 6;(141). doi: 10.3791/57942. PMID: 30474623.
42. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jun 18;26:e20170326. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0326. PMID: 29898174; PMCID: PMC6010327.
43. Fabris ALDS, Mulinari-Santos G, Hassumi JS, Freire AR, Faverani LP, Gruber R, Okamoto R. Morphometric and histologic characterization of alveolar bone from hypertensive patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017 Dec;19(6):1106-1113. doi: 10.1111/cid.12548. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29034574.
44. Bonardi JP, Pereira RDS, Boos Lima FBDJ, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Feb;76(2):325-335. doi: 10.1016/j.joms.2017.09.020. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29100829.
45. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1485-1494. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27460567.
46. Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LFM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, Faverani LP, Lucas FA. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? *Membranes (Basel)*. 2020 Sep 12;10(9):230. doi: 10.3390/membranes10090230. PMID: 32932731; PMCID: PMC7558580.
47. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309.
48. Benetti F, Briso ALF, de Araújo Lopes JM, Carminatti M, Conti LC, Gallinari MO, Ervolino E, Cintra LTA. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. *Int Endod J*. 2019 Dec;52(12):1723-1737. doi: 10.1111/iej.13190. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31322737.
49. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto Rde C, Gomes Filho JE, Briso AL. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J*

Appl Oral Sci. 2016 Jan-Feb;24(1):95-104. doi: 10.1590/1678-775720150393. PMID: 27008262; PMCID: PMC4775015.

50. Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Nov;20(11):1254-64. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01747.x. Epub 2009 Jun 15. PMID: 19531103.
51. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015 Jul;19(6):1319-27. doi: 10.1007/s00784-014-1369-0. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25563972.
52. Marques Ida S, da Cruz NC, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VA. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases.* 2015 Dec 7;10(4):041002. doi: 10.1116/1.4932579. PMID: 26446191.
53. Marques ID, Barão VA, da Cruz NC, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, Sukotjo C, Mathew MT. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci.* 2015 Nov 1;100:133-146. doi: 10.1016/j.corsci.2015.07.019. PMID: 26834277; PMCID: PMC4730887.
54. Liu J, Mohd Rafiq NB, Wong LM, Wang S. Surface Treatment and Bioinspired Coating for 3D-Printed Implants. *Front Chem.* 2021 Nov 18;9:768007. doi: 10.3389/fchem.2021.768007. PMID: 34869211; PMCID: PMC8636835.
55. Gouveia PF, Mesquita-Guimarães J, Galárraga-Vinueza ME, Souza JCM, Silva FS, Fredel MC, Boccaccini AR, Detsch R, Henriques B. In-vitro mechanical and biological evaluation of novel zirconia reinforced bioglass scaffolds for bone repair. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021 Feb;114:104164. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104164. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33243695.
56. Rohr N, Nebe JB, Schmidli F, Müller P, Weber M, Fischer H, Fischer J. Influence of bioactive glass-coating of zirconia implant surfaces on human osteoblast behavior in vitro. *Dent Mater.* 2019 Jun;35(6):862-870. doi: 10.1016/j.dental.2019.02.029. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30890265.
57. Pantulap U, Arango-Ospina M, Boccaccini AR. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2021 Dec 23;33(1):3. doi: 10.1007/s10856-021-06626-3. PMID: 34940923; PMCID: PMC8702415.
58. Al-Harbi N, Mohammed H, Al-Hadeethi Y, Bakry AS, Umar A, Hussein MA, Abbassy MA, Vaidya KG, Berakdar GA, Mkawi EM, Nune M. Silica-Based Bioactive Glasses and Their

Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Jan 20;14(2):75. doi: 10.3390/ph14020075. PMID: 33498229; PMCID: PMC7909272.

59. Tanios M, Brickman B, Cage E, Abbas K, Smith C, Atallah M, Baroi S, Lecka-Czernik B. Diabetes and Impaired Fracture Healing: A Narrative Review of Recent Literature. *Curr Osteoporos Rep*. 2022 Oct;20(5):229-239. doi: 10.1007/s11914-022-00740-z. Epub 2022 Aug 12. PMID: 35960475.
60. Elamir Y, Gianakos AL, Lane JM, Sharma A, Grist WP, Liporace FA, Yoon RS. The Effects of Diabetes and Diabetic Medications on Bone Health. *J Orthop Trauma*. 2020 Mar;34(3):e102-e108. doi: 10.1097/BOT.0000000000001635. PMID: 31469751. aspx
61. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and oral implant failure: a systematic review. *J Dent Res*. 2014 Sep;93(9):859-67. doi: 10.1177/0022034514538820. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24928096; PMCID: PMC4541101.
62. Abreu ECR de, Macedo DS de, Pejão S, Cosimato PL, Sendyk WR, Marão HF, Pimentel AC. Surface treatments of titanium and zirconia implants: Literature review . *RSD [Internet]*. 2021Jul.28 [cited 2023Aug.4];10(9):e37810918197. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18197>

## ANEXO

### Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos**", Processo FOA nº 0298-2021, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 01 de Julho de 2023.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Agosto de 2023.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the osteoinductive potential of implants and miniplates with bioactive glass-based coating via electrolytic plasma oxidation in the optimization of bone repair in diabetic rats**", Protocol FOA nº 0298-2021, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** July 01, 2023.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** August 01, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

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