



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

**RICARDO ALVES TOSCANO**

**A influência da texturização de superfície do titânio  
comercialmente puro (Ticp) com jateamento de zircônia e  
ataque ácido com adição de nanopartículas de  
hidroxiapatita em ossos de baixa densidade: Um estudo *in  
vitro e in vivo***

**Araçatuba - SP  
2021**

**RICARDO ALVES TOSCANO**

**A influência da texturização de superfície do titânio  
comercialmente puro (Ticp) com jateamento de zircônia e  
ataque ácido com adição de nanopartículas de  
hidroxiapatita em ossos de baixa densidade: Um estudo *in  
vitro* e *in vivo***

Tese 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 Doutor em Implantodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba - SP  
2021**

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

T713i Toscano, Ricardo Alves.  
A influência da texturização de superfície do titânio comercialmente puro (Ticp) com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita em ossos de baixa densidade : um estudo in vitro e in vivo / Ricardo Alves Toscano – Araçatuba, 2021  
69 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Regeneração óssea 2. Osseointegração  
3. Durapatita I. T.

Black D7  
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedico esta conquista a razão do meu perseverar: **a minha família.***

*Aos meus pais **Enaldo Luis Toscano e Celma Alves Toscano**, por toda sua história construída em unidade e fundamentada em fazer o melhor para seus Filhos.*

*À minhas irmãs **Raquel, Rogéria e Rafael,***

*Por todo suporte incondicional.*

*À minha esposa **Renata Kruger Toscano**,*

*Por respeitar meu momento e em silêncio me dizer tantas coisas.*

*As minhas filhas **Mariana e Luiza,***

*As futuras cirurgiãs-dentistas que já acreditam que através da odontologia podem contribuir na construção de um mundo melhor.*

## AGRADECIMENTOS

***A Deus,***

Que tudo pode e tudo sabe.

***Ao meu orientador Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção***

Por acreditar em mim e trazer a tona que toda conquista é feita de etapas.  
Entrego minha mais sublime e consciente forma de agradecer: Muito Obrigado!

***Ao meu coorientador Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani***

Por me fazer entender que o grande sentido da vida, não é dizer Eu te Amo e sim, fazer as pessoas se sentirem amadas.

***Aos professores membros da Banca Examinadora***

Pela disponibilidade e apoio.

***Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba,***

Pelas oportunidades abertas, pelo exemplo de dedicação.

***A todos os colegas da PG FOA-UNESP ,***

Por todo o apoio e incentivo.

***Que faria a ciência sem o amor? Envaideceria.  
Que faria o amor sem a ciência? Erraria.***

**São Bernardo de Claraval.**

TOSCANO, R. A. **A influência da texturização de superfície do titânio comercialmente puro (Ticp) com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita em ossos de baixa densidade: um estudo in vitro e in vivo.** 2021. 69 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## RESUMO

Os implantes médicos-odontológicos constituídos por titânio (Ticp) são constantemente modificados, em especial, a sua topografia, para a obtenção de melhores propriedades físico-químicas e biológicas dos tecidos periimplantares. Assim, o maior desafio atual é desenvolver uma superfície na topografia dos implantes para melhorar a reparação óssea em áreas críticas no que se refere à estabilidade dos tecidos peri-implantares, representadas principalmente por ossos de menor densidade. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi analisar as superfícies por meio desses parâmetros em osso de baixa densidade. Os parâmetros estruturais, imunoistoquímicos e reparacionais por meio de um método de jateamento de zircônia e ataque ácido com adição nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE). Para isso, foi realizado a caracterização estrutural da superfície de discos tratados por meio da superfície de implantes tratadas por jateamento de zircônia e outra tratada por adição de nanopartículas de HA, ou seja, jateamento de zircônia e ataque ácido de acordo com padrões comerciais, através das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria, energia livre de superfície e análise de microdureza. Para o estudo *in vivo* foram utilizadas 22 ratas Wistar, as quais foram submetidas a ovariectomia bilateral e após 90 dias, realizou-se instalação de implantes de ambas as superfícies utilizadas neste estudo. Para avaliar os efeitos das texturizações no reparo periimplantar realizou-se as análises de histologia e imunistoquímica aos 14 e 28 dias pós-operatório, contra-torque aos 28 dias e histometria aos 60. Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análise estatística com nível de significância de 0,05. Os resultados da caracterização da superfície demonstraram que o grupo TESTE promoveu alteração na morfologia superficial, com formação de poros distribuídos homogeneamente. Os resultados de energia livre de superfície, microdureza e rugosidade foram semelhantes entre os grupos. Em relação ao reparo periimplantar, foi observado maior contra-torque para TESTE ( $p=0,030$ ) e tendência a apresentar maior AON e

ELCOI do que o grupo PADRÃO. A análise histológica qualitativa constatou melhor maturação óssea para o grupo TESTE aos 14 e 28 dias e perfil inflamatório satisfatório para ambos os grupos. Os resultados obtidos nesse estudo foram bastante favoráveis e promissores, estimulando a realização de mais estudos para futura aplicação clínica da texturização proposta.

**Palavras-chave:** Regeneração óssea. Osseointegração. Hidroxiapatita.

TOSCANO, R. A. **The influence of commercially pure titanium surface texturing (Ticp) with zirconia blasting and acid etching with addition of hydroxyapatite nanoparticles on low density bones: An in vitro and in vivo study.** 2021. 69 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## **ABSTRACT**

The medical-dental implants, made from titanium (Ticp) are constantly modified, mostly its topography, to obtain better physic-chemical and biological properties of the peri implant tissues. Therefore, the biggest challenge today is to develop a surface on the implant's topography to improve the bone restoration on critical areas, regarding the peri implant tissue stability, represented primarily by lower density bones. The aim of this study was to analyze the structural, immunohistochemical and repair parameters through the method of zirconia staining and acid etching with the addition of hydroxyapatite nanoparticles (TEST group) in low density. For this, initially a structural characterization of the surface of treated discs was carried out by means of the TEST surface, and also of the STANDARD surface, that is, zirconia blasting and acid etching according to commercial standards, through scanning electron microscopy analysis (SEM), profilometry, surface free energy and microhardness analysis. For the in vivo study, 22 Wistar rats were used, which were submitted to bilateral ovariectomy and after 90 days, implants were installed on both surfaces used in this study. To assess the effects of texturization on peri-implant repair, histology and immunohistochemistry analyzes were performed at 14 and 28 days after surgery, counter-torque at 28 days and histometry at 60 days. All quantitative data obtained were submitted to statistical analysis with a significance level of 0.05. The results of the surface characterization showed that the TEST group promoted changes in the surface morphology, with the formation of homogeneously distributed pores. The results of surface free energy, microhardness and roughness were similar between groups. Regarding the peri-implant repair, a higher counter-torque was observed for the TEST ( $p=0.030$ ) and a tendency to present higher BIC and BAFO than the STANDARD group. Qualitative histological analysis found better bone maturation for the TEST group at 14 and 28 days and a satisfactory inflammatory profile for both groups. The results obtained in this study were very favorable and

promising, encouraging further studies for future clinical application of the proposed texturing.

**Keywords:** Bone regeneration. Osseointegration. Hydroxyapatite.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AON	Área de osso neoformado
ELCOI	Extensão linear de contato osso/implante
HA	Hidroxiapatita
OCN	Imunomarcção para osteocalcina
Ti	Titânio
TPS	Plasma spray de titânio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Aspecto final dos espécimes após texturização de superfície. Da esquerda para a direita: Disco tratado por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE) e disco tratado apenas por jateamento de zircônia e ataque ácido (grupo PADRÃO)	21
FIGURA 2 -	Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E)	24
FIGURA 3-	Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (a) Tricotomia na região de ambas as metáfises tibiais. (b) Antissepsia das regiões com PVPI. (c) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial, seguida da divulsão dos planos; (d) Fresagem com lança fresa de 1,4 mm montada em motor convencional; (e) Preparo na metáfise tibial realizado; (f) Instalação dos implantes com rosqueamento digital; (g) reposicionamento dos tecidos; (h) Sutura por planos anatômicos	26
FIGURA 4 -	Imagens representativas de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para o cálculo dos parâmetros histométricos: ECLOI e AON. (A) setas vermelhas indicam o perímetro de osso localizado na interface osso/implante, corado pelo vermelho de alizarina; (B) a seta vermelha indica o cálculo de área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante	28
FIGURA 5 -	Fotomicrografias referentes a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (magnitude de 1000x e 2000x) da superfície dos discos de Ticp para os grupos PADRÃO (A: 1000x e B: 2000x) e TESTE (C: 1000x e D: 2000x). A superfície experimental TESTE demonstrou características mais complexas, com presença de inúmeros poros distribuídos homoganeamente	31
FIGURA 6 -	Representação gráfica da média da rugosidade Ra da liga Ticp em função das modificações de superfície em ambos os grupos experimentais, com discreta tendência de maior rugosidade para o grupo TESTE, entretanto sem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ )	32
FIGURA 7 -	Representação gráfica da média da energia livre de superfície em relação ao ângulo de contato para água e diiodometano da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos PADRÃO e TESTE. Os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante em relação aos componentes polar e dispersivo ( $p>0,05$ )	33
FIGURA 8 -	Representação gráfica da média da microdureza de Vickers da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos PADRÃO e TESTE. Não houve diferenças na propriedade de microdureza entre ambas as superfícies ( $p>0,05$ )	34
FIGURA 9 -	Imagens representativas do tecido ósseo nas espiras mais centrais da região periimplantar, observadas durante análise histométrica. É notável presença de perfil reparacional mais favorável ao grupo TESTE, com menor quantidade de tecido conjuntivo (CT) entremeado ao tecido ósseo neoformado (BT) comparado ao grupo PADRÃO	35
FIGURA 10 -	Representação gráfica da análise de Área de Osso Neoformado nas	35

	espiras mais centrais da região periimplantar, demonstrando maior neoformação para o grupo TESTE, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,178$ )	
FIGURA 11 -	Representação gráfica da análise de Extensão Linear de Contato Osso/Implante (ELCOI) para os grupos experimentais. Apesar de não haver grandes diferenças na comparação dos resultados de ambos os grupos, nota-se discreta tendência de maior ELCOI para o grupo TESTE ( $p=0,691$ )	36
FIGURA 12 -	Representação gráfica da análise biomecânica de contra-torque, realizada por meio de torquímetro digital, evidenciando que para o grupo TESTE foi necessário maior contra-torque até o efetivo rompimento da interface formada entre tecido ósseo e implante ( $p<0,05$ )	37
FIGURA 13 -	Fotomicrografias em objetiva de 20x para representação das características do tecido ósseo periimplantar observado por meio da análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina), para ambos os grupos experimentais, aos 14 e 28 dias pós-operatórios. Destaca-se a o perfil mais maduro do tecido ósseo para o grupo TESTE, com menor presença de células e maior quantidade de osso neoformado propriamente dito	38
FIGURA 14 -	Fotomicrografias em objetiva de 100x para representação da maturação do tecido ósseo da espira mais central de cada grupo experimental (PADRÃO e TESTE) aos 14 e 28 dias pós-operatório, evidenciando maturação mais avançada para grupo TESTE, com menor quantidade de células e maior neoformação óssea para ambos os tempos experimentais, quando comparado ao grupo PADRÃO	39
FIGURA 15 -	Representação gráfica referente a contagem de células inflamatórias em região periimplantar, demonstrando que ambas as superfícies analisadas no estudo não apresentam respostas inflamatórias exacerbadas e efeitos citotóxicos	40
FIGURA 16 -	Representação gráfica referente a contagem de vasos sanguíneos em região periimplantar. Os resultados semelhantes para ambos os grupos reforçam a ideia de biocompatibilidade e ausência de efeitos citotóxicos de ambas as superfícies	40
FIGURA 17 -	Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcagem para Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para ambos os grupos experimentais, no período de 14 dias. Nota-se imunomarcagem confinada no citoesqueleto do citosol celular e matriz extracelular, que foi discretamente maior para o grupo PADRÃO ( $p>0,05$ )	41
FIGURA 18 -	Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcagem para Osteocalcina (OCN) para ambos os grupos experimentais, no período de 28 dias. A imunomarcagem no citosol celular foi de intensidade moderada e semelhante entre os grupos PADRÃO e TESTE	42

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Texturização de superfície por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita	19
3.2 Caracterização estrutural	22
3.2.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	22
3.2.2 <i>Perfilometria – análise da rugosidade de superfície</i>	22
3.2.3 <i>Energia livre de superfície</i>	22
3.2.4 <i>Análise de microdureza</i>	23
3.3 Animais: Desenho experimental de indução da osteoporose	23
3.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias	25
3.5 Métodos de análise do reparo ósseo periimplantar	26
3.5.1 <i>Histometria</i>	27
3.5.2 <i>Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)</i>	28
3.5.3 <i>Análise histológica</i>	29
3.5.4 <i>Imunoistoquímica</i>	30
3.6 Método de análise dos resultados	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterização estrutural	31
4.1.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	31
4.1.2 <i>Perfilometria – análise de rugosidade de superfície</i>	32
4.1.3 <i>Energia livre de superfície</i>	32
4.1.4 <i>Análise de microdureza</i>	33
4.2 Histometria	34
4.3 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)	36
4.4 Análise histológica	37
4.5 Imunoistoquímica	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

## 1 INTRODUÇÃO

No contexto da implantodontia, a utilização do Titânio (Ti) tem sido amplamente investigada pela literatura, sendo que, atualmente mais de 98% dos implantes osseointegráveis são constituídos de Ti, especialmente o Ti grau IV (ASTM F67), onde a incorporação de elementos como Sílica e Ferro, restantes durante o processo de fundição, forjamento ou laminação, aumentam a resistência mecânica do material (1).

Além da resistência mecânica, é importante se pensar nas interações biológicas necessárias para a garantia do sucesso a longo prazo das reabilitações implantossuportadas. Nesse sentido, é de grande importância alcançar e manter a osseointegração e a integração epitelial estável. A osseointegração garante um rígido suporte para a restauração protética, conferindo a adequada transferência de forças ao osso adjacente durante a função mastigatória (2). Já a integração epitelial do tecido mucoperiimplantar consiste no estabelecimento de uma área de barreira epitelial, que atua protegendo o tecido ósseo subjacente e impede a penetração de microorganismos (3).

Durante os 50 anos dos princípios da osseointegração, a indústria biomédica desenvolveu modificações contínuas na busca por implantes com propriedades estruturais e biológicas satisfatórias, na expectativa de alcançar uma maior estabilidade, adequada muointegração e conseqüentemente maior longevidade dos tratamentos reabilitadores. Os trabalhos relacionados aos processos de texturização de superfície dos implantes dentários buscam desenvolver meios que sejam capazes de atuar no aumento da resistência mecânica, à corrosão, bem como favorecer as respostas biológicas da osseointegração, pela maior área de superfície de contato, atraindo de forma mais eficaz e mais rapidamente células da linhagem osteoblástica, em especial em regiões de menor densidade do tecido ósseo (4–6).

Diversas modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes dentários foram desenvolvidas (7–10), em que se destacam principalmente as técnicas de adição, as quais promovem uma superfície do implante com saliências (recobertas por plasma spray de titânio - TPS e de hidroxiapatita - HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio e deposição

de íons) (5,6,8) ou técnicas de subtração por meio da criação de poros na superfície do implante (eletropolimento, polimento mecânico, tratamentos com ácidos, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio –  $TiO_2$  ou óxido de alumínio –  $Al_2O_3$ , oxidação e irradiação com laser (11–13).

Estudos comparando os implantes dentários de superfície usinada com superfície rugosa mostraram superioridade dos resultados de reparo ósseo nos implantes com superfície modificada (10,13,14). Os fatores que influenciam na melhor e mais rápida osteogênese para estas superfícies estão relacionados à melhor retenção do coágulo sanguíneo, aumento da migração, proliferação celular e aumento da área de contato da superfície do implante (10,13).

Uma preocupação diante desta gama de opções de texturização é reunir características favoráveis tanto nos aspectos microestruturais como nos aspectos biológicos reparacionais (8,15–17). A incorporação de elementos que são precipitados na matriz do tecido ósseo, tal como o cálcio, fósforo ou hidroxiapatita é uma técnica bastante interessante no processo de texturização por adição, a qual tem demonstrado maior afinidade com as células fundamentais de formação de osso (13).

Para que ocorra o fenômeno da osseointegração, um fator essencial é a qualidade do tecido ósseo, uma vez que durante toda a vida o complexo implante/tecido ósseo periimplantar será submetido às constantes oscilações térmicas, químicas e mecânicas, as quais induzirão a um processo de remodelação acoplada. Deste modo, o tecido ósseo não é estático e para que desempenhe suas funções de suporte e homeostase mineral de forma saudável, é necessário um processo de remodelação contínua (18,19). Este processo dinâmico envolve a reabsorção, formação e mineralização óssea de forma coordenada. Quando há algum fator que possa alterar o balanceamento deste catabolismo e anabolismo, a qualidade do tecido esquelético pode ser severamente comprometida, resultando no desenvolvimento de uma condição patológica (20).

Dentre as alterações do metabolismo ósseo que podem comprometer a taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis, destacamos a osteoporose (21). Esta alteração esquelética sistêmica, é caracterizada pela perda óssea progressiva, ocasionada devido ao processo de desequilíbrio da atividade de remodelação óssea,

causando deterioração da microarquitetura óssea, com diminuição expressiva da densidade óssea, com formação de trabéculas ósseas mais finas e por vezes com menor atividade angiogênica. Esta desordem do metabolismo ósseo é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa, e por mais que não contra-indique a realização de tratamento reabilitador, reduz de forma expressiva a taxa de sobrevivência dos implantes (21–24).

Diante disso, torna-se necessário a realização de estudos que busquem a otimização do processo de reparo ósseo ao redor de implantes osseointegráveis. Um bom modelo experimental animal para isso é a instalação de implantes na metafise tibial de ratos, visto que a microarquitetura óssea deste osso longo é a que mais se assemelha ao osso alveolar humano, mimetizando as interações teciduais a serem analisadas (25–29). Atrelado a instalação de implantes, os ossos de menor densidade, caracterizados pela osteoporose experimental, categorizam-se como um modelo interessante tanto para a verificação da influência dos métodos de texturização de superfície dos implantes, bem como para o comportamento biológico da osseointegração.

## **2 OBJETIVO**

Este estudo objetivou analisar a superfície de um método de jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita nos parâmetros estruturais, imunoistoquímicos e reparacionais do tecido ósseo de baixa densidade.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho consta de 2 fases: 1- texturização realizada inicialmente uma caracterização estrutural da superfície de discos tratados pela texturização por um método de jateamento de zircônia e ataque ácido (grupo PADRÃO) e também dos discos com tratamento por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE), conforme fornecimento comercial, no período baseline, por meio das análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Perfilometria, Energia livre de superfície e análise de Microdureza. 2- Trabalho "in vivo" como proposta da avaliação do reparo ósseo periimplantar in vivo, foi realizada cirurgia de ovariectomia bilateral em todos os ratos para indução de osteoporose e após 90 dias desta, realizada cirurgia para instalação dos implantes do grupo TESTE e do grupo PADRÃO em tíbia, de forma randomizada. Como métodos de análise realizou-se histometria, análise biomecânica de contra-torque, análise histológica e imunoistoquímica. Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análise estatística.

#### **3.1 Texturização de superfície por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita**

Para a caracterização estrutural da superfície desenvolvida e avaliação da sua influência no reparo periimplantar, 20 discos e 22 implantes de T1cp grau 4 (99,7 Ti; 0,16 O<sub>2</sub>; 0,004 N<sub>2</sub>; 0,006 C; 0,0019 H<sub>2</sub> e 0,12 Fe em % de peso), de 2mm de diâmetro e 4,5mm de comprimento (26) fornecidos pela empresa DSP Biomedical (Campo Largo- Pr) foram utilizados.

Os discos foram polidos e limpos através de métodos padronizados de metalografia por meio de lixas sequenciais (#320, #400, #600, #800). A rugosidade de superfície de todos os discos foi determinada a fim de proporcionar uma padronização no acabamento dos discos de T1cp. Os discos foram limpos em cuba ultrassônica com água deionizada (10 minutos) e propanol a 70% (10 minutos) e finalmente secos por meio de jatos de ar quente a 250°C (15,26,30).

A partir deste momento, discos e implantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo 10 discos e 11 implantes destinados para o processo de

texturização com jateamento de zircônia e ataque ácido de acordo com os padrões estabelecidos pela empresa do setor de implantodontia (grupo PADRÃO), enquanto os 10 discos e 11 implantes restantes foram destinados para o método de texturização de superfície com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE) (Figura 1).

A texturização foi iniciada pelo jateamento de partículas de zircônia produzindo uma microtexturização superficial por subtração. Para isso, a superfície foi bombardeada por partículas de zircônia de 70  $\mu\text{m}$  à uma distância de 5 cm do bico do revólver de jateamento por 20 segundos com pressão de 6 Bar criando superfícies com ranhuras irregulares por meio da abrasão.

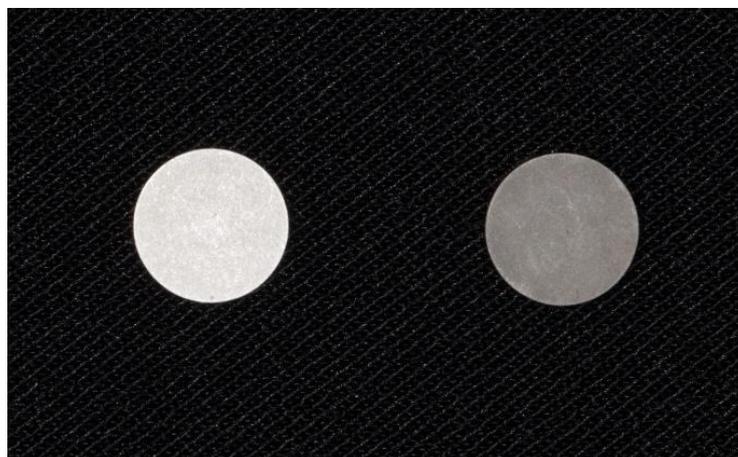
A segunda etapa da texturização após o jateamento foi o ataque ácido das superfícies caracterizando o processo de subtração por ácido. Os elementos foram condicionados em tubo de ensaio Becker em soluções de ácido hidrófluorídrico (HF) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) com quantidade suficiente para cobrir as peças que permaneceram no banho por 40 minutos. O conteúdo do recipiente foi homogeneizado com bastão de vidro a cada 5 minutos. Ao final destes 40 minutos do processo descrito o ácido foi substituído e a metodologia foi repetida seguindo os mesmos parâmetros. Após esse período o ácido foi removido e, no mesmo recipiente os implantes foram banhados por água destilada por 4 vezes. Os implantes foram depositados em tubo de ensaio de Becker, preenchidos com água destilada, e levados à cuba ultrassônica (Setecsom - Mairiporã, São Paulo - Brasil) por 40 minutos e foi efetuada a troca da água destilada a cada 10 minutos. Após a remoção dos discos e implantes da cuba ultrassônica, os mesmos receberam banho de vapor na caldeira C 5 (CR - Curitiba, Paraná- Brasil). Os implantes foram secos na estufa (Odontobrás- Ribeirão Preto, São Paulo- Brasil) por 5 horas a 100°C.

Para a adição de nanopartículas de hidroxiapatita nos discos e implantes do grupo TESTE, seguiu-se o processamento biomimético. O processo teve o tratamento alcalino dos discos e implantes com solução aquosa de NaOH 1M em autoclave vertical (Fanem - São Paulo, São Paulo- Brasil) à 130°C por 60 minutos, depois secos em temperatura ambiente. O tratamento térmico dos discos e implantes foi executado em forno tubular (EDG - São Carlos, São Paulo- Brasil) a 200°C por 1 hora com aquecimento de 10°C/min. Os discos e implantes foram imersos em 5 mL de fluido corpóreo simulado modificado (FCSm), a 37°C trocado a

cada 2 dias, retirados após um período de 14 dias. Após a retirada da solução, os implantes foram mantidos em dessecador para evitar contaminação e lavados com água destilada.

A preparação da solução (FCSm) foi realizada com a lavagem de todo material utilizado com água destilada. Posteriormente, a solução de HCl 1M foi usada na lavagem e o material enxaguado cinco vezes com água deionizada pura. A secagem do material em estufa foi por dissolução dos reagentes em recipiente de boca larga e usando agitação moderada. Um terço de água deionizada pré-aquecida a 37°C em estufa foi colocada no frasco para dissolução. Os reagentes foram pesados em balança analítica e transferidos ao frasco um a um de acordo com a composição e massa do FCS modificado por Andrade et al. 2002. A solução então foi agitada por 10 a 15 minutos para homogeneização. O ajuste de pH foi feito transferindo a solução à 37°C para um béquer sob agitação moderada e adicionado água pré-aquecida até o volume da solução ser de pelo menos três quartos do volume final. O pH da solução ficou na faixa de 7,5 – 8,0 sendo controlado com a adição de sulfato de cálcio. A aferição do volume final foi feita após a solução ter sido colocada num balão volumétrico. O volume final de um litro foi completado com água demonizadas. Após a aferição, o balão foi tampado e a solução homogeneizada agitando-a por quarenta vezes. A armazenagem da solução foi em frasco de polietileno previamente limpo que permaneceu em geladeira.

**FIGURA 1 - Aspecto final dos espécimes após texturização de superfície. Disco (1) tratado por jateamento de zircônia e ataque ácido (grupo PADRÃO) e disco (2) tratado apenas por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## **3.2 Caracterização estrutural**

### **3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização da superfície dos discos de Ticp. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento (31).

### **3.2.2 Perfilometria – análise da rugosidade de superfície**

A rugosidade de superfície (Ra - média aritmética) foi mensurada por meio de um perfilômetro com deslocamento (cut-off) de 500 µm em tempo constante de 12 segundos. Três mensurações foram obtidas para cada disco de Ticp e a média calculada (16,25,32).

### **3.2.3 Energia livre de superfície**

A análise da energia livre de superfície foi mensurada de acordo com o protocolo sugerido por (33) e foi obtida com auxílio de um goniômetro (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). Os discos foram lavados com detergente líquido neutro e enxaguados com água deionizada até a completa remoção de qualquer traço de detergente. Foram submetidos a dois banhos ultrassônicos, o primeiro com uma solução de metanol e água destilada (1:1) por 10 minutos e o segundo com água destilada por 10 minutos, e então deixados para secar naturalmente.

Para determinação da energia livre de superfície, foi mensurado o ângulo de contato formado entre a superfície do disco e uma gota séssil de cinco líquidos teste, Diiodometano, Etilenoglicol, Formamida, Glicerol e água destilada e deionizada. Esta mensuração foi realizada em três gotas de cada líquido em ambiente com temperatura de  $21 \pm 1$  °C e umidade controlada.

Cada gota séssil (15 µL) foi depositada na superfície do disco por meio de um dispensador automático acoplado ao goniômetro. A imagem obtida foi capturada

imediatamente pelo aparelho e os ângulos de contato formados pelos líquidos na superfície do substrato foram mensurados automaticamente por meio do software Ramé-hart DROPimage Standard (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). O software do equipamento fez os cálculos e forneceu os valores do componente polar e apolar, bem como da energia livre de superfície (33).

### **3.2.4 Análise de microdureza**

Foi realizada a microdureza dos discos, no período baseline, por meio de um microdurômetro (Shimadzu HMV-2000 Micro Hardness Tester; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Esse teste foi realizado em temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Quatro mensurações em áreas distintas foram realizadas em cada espécime, carga aplicada de 500 kgF por 15 segundos e o valor médio foi calculado. A microdureza está expressa em unidade de dureza de Vicker (VHN) (45, 46). Os valores de microdureza foram calculados usando a seguinte fórmula:  $VHN = 2P \sin(136^\circ / 2) / d^2$ , na qual P = carga aplicada e d = comprimento das endentações de diagonais.

## **3.3 Animais: Desenho experimental de indução da osteoporose**

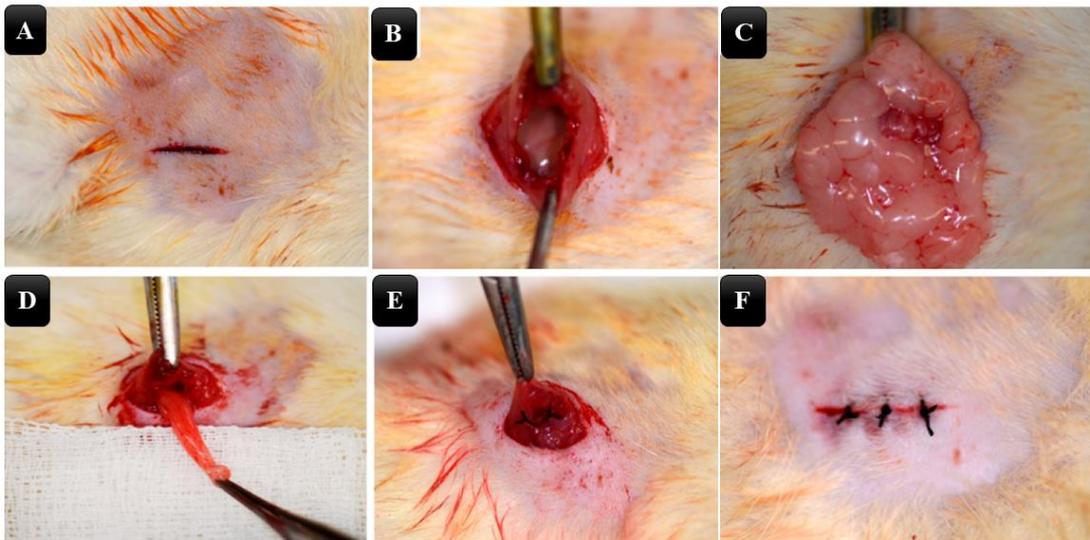
Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tanto, foi obtido o parecer favorável do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo FOA nº 00528-2018).

Foram utilizadas 22 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas (n=11 tíbias por grupo experimental), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório

Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos. Para a definição do número da amostra, inicialmente foi realizado o cálculo do poder do Teste ("Power Test") no website: [http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua\\_2\\_medias.html](http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html), em que para a obtenção de um poder de 0,8, com nível de significância de 5%, diante dos grupos amostrais, o número mínimo de amostras sugerido por grupo foi de 11.

Após esta fase da pesquisa, todas as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Para tanto, foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e cloridrato de ketamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, sendo posteriormente realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, foram localizados os ovários e os chifres uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl<sup>tm</sup> – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos), seguida da remoção dos ovários. Por fim, foi realizada sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl<sup>tm</sup> – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (Figura 2).

**FIGURA 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E)**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Estes animais continuaram no biotério sendo alimentados com ração e água *ad libitum* durante todo o tempo experimental.

### 3.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias

Após 90 dias da cirurgia de ovariectomia para indução da osteoporose, todos os animais passaram por jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico para instalação dos implantes em tíbia. Em seguida, foram sedadas pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

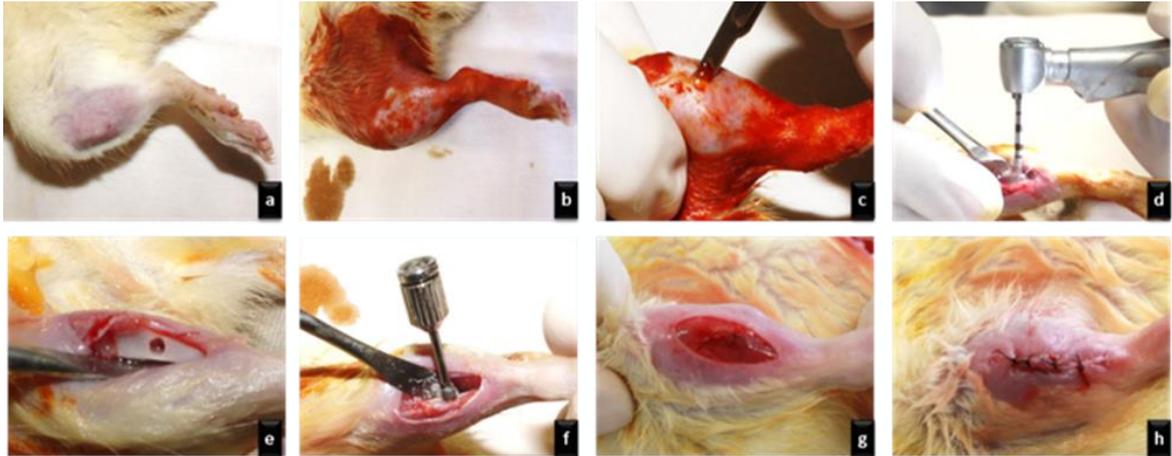
Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather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

de periosteio, expondo o osso para receber os implantes. Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície texturizada por ataque ácido e jateamento de zircônia de acordo com os parâmetros da empresa do Setor que forneceu os implantes, ou implantes com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição nanopartículas de hidroxiapatita. As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2 mm e altura de 4,5 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0mm, com travamento e estabilidade inicial (Figura 3).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. A escolha das tíbias para a instalação de implantes do grupo teste e controle foi feita de forma aleatória, por meio do website: [www.randomization.com](http://www.randomization.com).

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

**FIGURA 3 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (a) Tricotomia na região de ambas as metáfises tibiais. (b) Antissepsia das regiões com PVPI. (c) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial, seguida da divulsão dos planos; (d) Fresagem com lança fresa de 1,4 mm montada em motor convencional; (e) Preparo na metáfise tibial realizado; (f) Instalação dos implantes com rosqueamento digital; (g) reposicionamento dos tecidos; (h) Sutura por planos anatômicos**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### 3.5 Métodos de análise do reparo ósseo periimplantar

Aos 60 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 100mg/kg) pela via intramuscular e as amostras coletadas foram destinadas a processamento para análises em tecidos calcificados e descalcificados.

#### Análises para tecidos calcificados

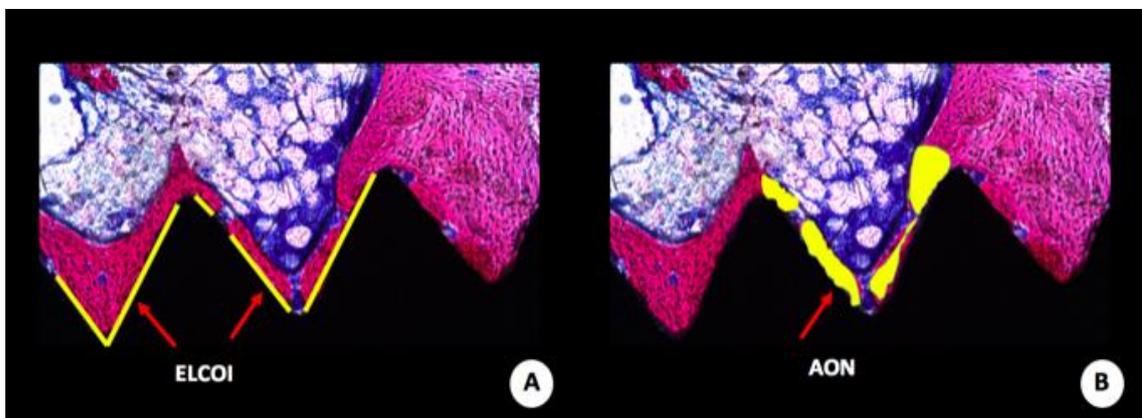
##### 3.5.1 Histometria

Para a análise histométrica 6 animais foram submetidos à eutanásia 60 dias após a instalação dos implantes (reparo ósseo periimplantar). Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que fosse utilizada apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e em seguida passaram pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System,

Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exakt Cutting System, Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  de espessura.

As lâminas obtidas foram então lavadas em água deionizada e foram coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Histometricamente, foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) bilateralmente e da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante. Como cada implante presente na lâmina foi uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas nos dois lados do implante, de forma que sua média foi considerada como valor representativo da unidade (Figura 4). Assim, após a fotomicrografia das lâminas e salvas em arquivo TIFF, essas foram transportadas para o programa computacional Image J (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), que por meio da ferramenta “straight”, foi calculado o perímetro de osso formado na interface osso/implante (ELCOI) em micrometros, como descrito anteriormente. E para o cálculo de AON, a ferramenta “free hands” foi utilizada para mensurar a área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante em  $\mu\text{m}^2$ .

**FIGURA 4 -** Imagens representativas de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para o cálculo dos parâmetros histométricos: ELCOI e AON. (A) setas vermelhas indicam o perímetro de osso localizado na interface osso/implante, corado pelo vermelho de alizarina; (B) a seta vermelha indica o cálculo de área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### **3.5.2 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)**

Para a análise biomecânica, os animais deste grupo (n= 4 tíbias por grupo experimental) foram sedados com cloridrato de quetamina e xilazina, 28 dias após a instalação dos implantes, e tiveram as metáfises das tíbias acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante.

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

## **Análises para tecidos descalcificados**

### **3.5.3 Análise histológica**

Nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios, 6 amostras de cada grupo, em cada período, foram encaminhados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento se iniciou com a descalcificação em EDTA (10%), de modo que as peças foram imersas em solução para descalcificação, a qual foi trocada semanalmente até se observar a diminuição da resistência à passagem de uma agulha para seringa carpule, 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.

Após a microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), sendo analisada a cronologia do reparo ósseo na região periimplantar, observando-se a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade do tecido ósseo, com avaliação da sua maturidade, assim como presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos

sanguíneos. Para isso, as lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região das espiras mais centrais, inicialmente em uma objetiva de 20x, que conferiu uma visão ampla da área de tecido ósseo neoformado. Para observação da maturação e das características do tecido ósseo dos diferentes grupos, realizou-se fotomicrografias em um objetiva de 100x.

Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, realizou-se, para cada amostra, três fotomicrografias em objetivas de 100x, em diferentes regiões da área periimplantar. Em seguida, tais imagens foram também submetidas à análise por meio do software Image J, utilizando a ferramenta “Grid”, com 130 pontos de intersecção, como meio de facilitar a visualização das células e dos vasos sanguíneos. Além disso, foi utilizada a ferramenta “Cell Counter Notice”, para a contagem propriamente dita das estruturas mencionadas.

#### **3.5.4 Imunoistoquímica**

Das lâminas confeccionadas que foram descalcificadas e incluídas em parafina, as de número ímpar foram destinadas às reações de imunoistoquímica, onde a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram: anti VEGF aos 14 dias pós-operatório e osteocalcina (OC) aos 28 dias.

O anticorpo secundário utilizado foi o biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representaram: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo consideradas positivas as marcações com

diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

### **3.6 Método de análise dos resultados**

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos com as análises realizadas, foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (Teste vs Padrão). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade para determinação do teste mais adequado (paramétrico versus não paramétrico). O nível de significância de 0,05 foi usado para todos os testes. O programa estatístico será o SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

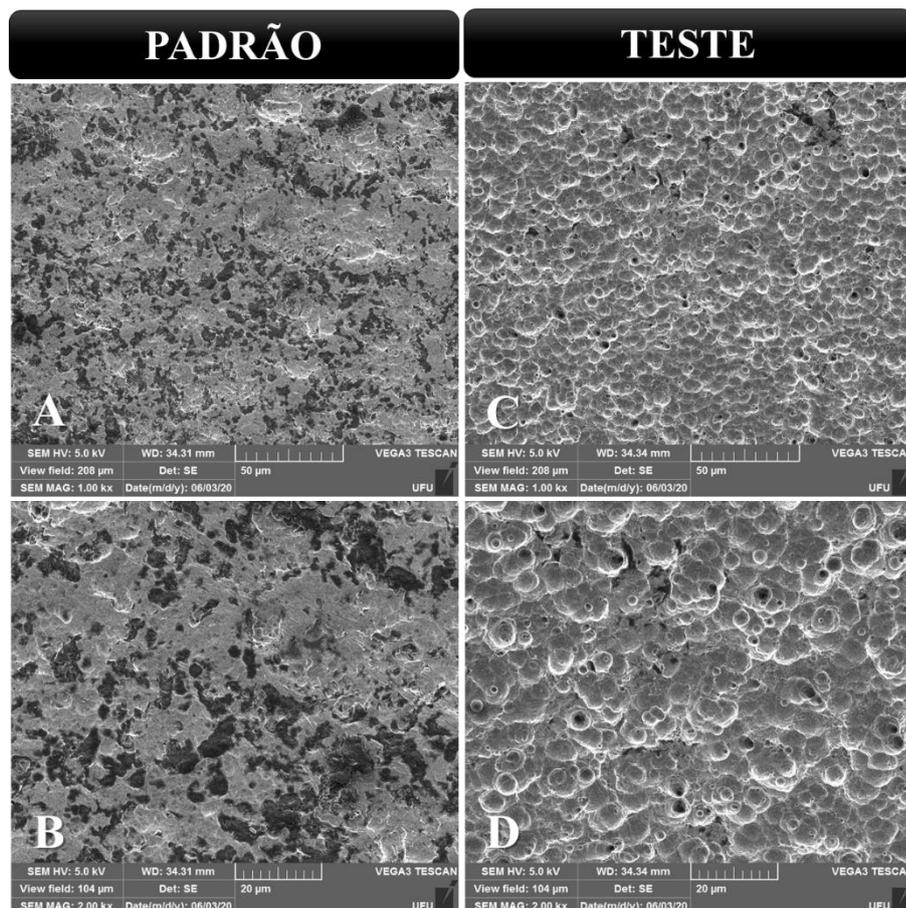
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização estrutural

#### 4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias referentes ao grupo PADRÃO demonstraram uma superfície bastante irregular com a formação de vales amplos indicados pelas regiões mais escuras da superfície. Enquanto isso, para o grupo TESTE a superfície irregular foi preenchida por inúmeros poros com formato de “vulcão” e demonstrando ao mesmo tempo a incorporação de partículas na superfície com ausência dos vales profundos encontrados no outro grupo (Figura 5).

**FIGURA 5 – Fotomicrografias referentes a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (magnitude de 1000x e 2000x) da superfície dos discos de Ticp para os grupos PADRÃO (A: 1000x e B: 2000x) e TESTE (C: 1000x e D: 2000x). A superfície experimental TESTE demonstrou características mais complexas, com presença de inúmeros poros distribuídos homogeneamente**

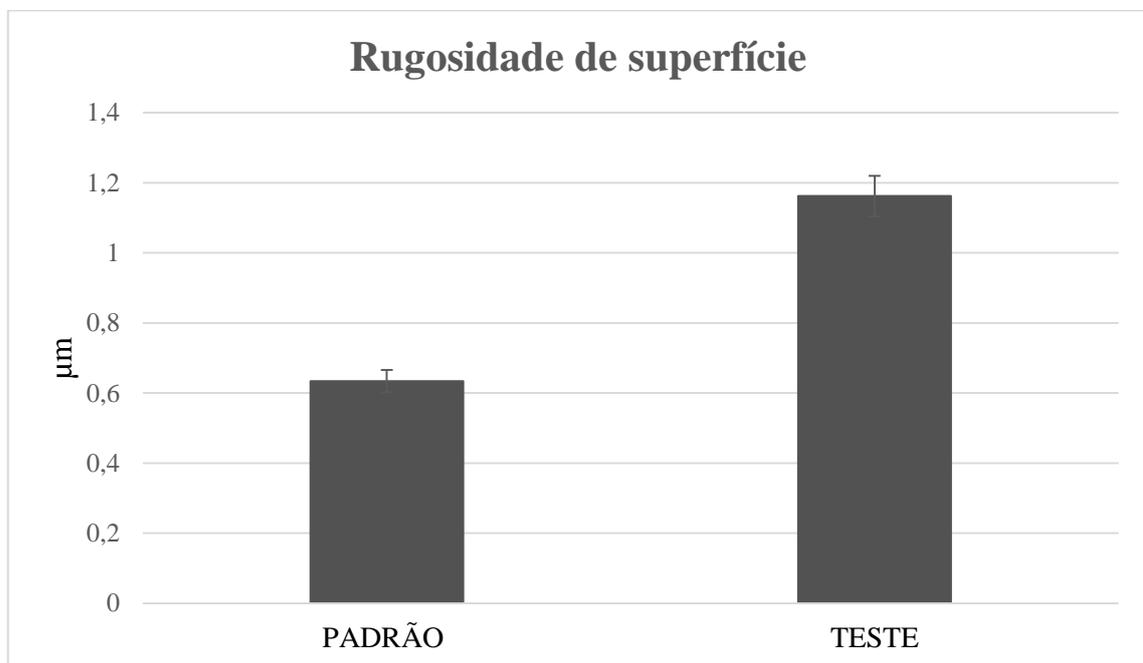


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

#### 4.1.2 Perfilometria – análise de rugosidade de superfície

Com relação a rugosidade das superfícies avaliadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, apesar disso, houve uma tendência para o grupo TESTE em apresentar maior rugosidade em comparação a PADRÃO (Figura 6).

**FIGURA 6 - Representação gráfica da média da rugosidade Ra da liga Ticp em função das modificações de superfície em ambos os grupos experimentais, com discreta tendência de maior rugosidade para o grupo TESTE, entretanto sem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ )**

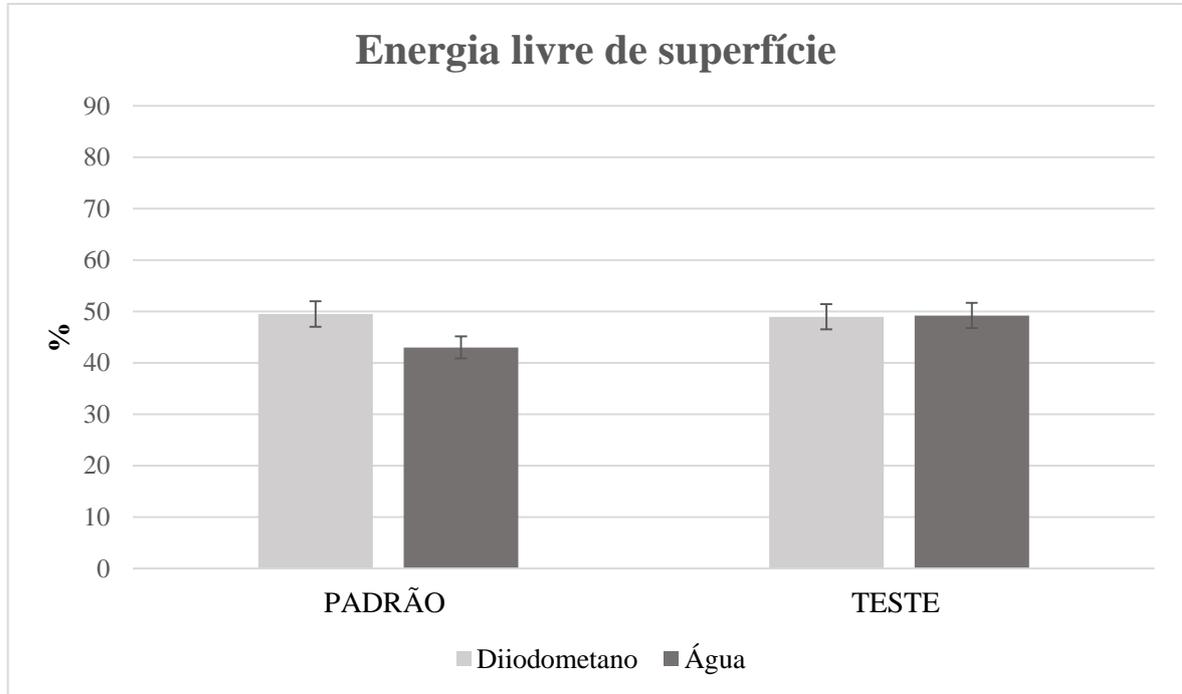


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

#### 4.1.3 Energia livre de superfície

A análise de ELS avaliou componentes polares (água) e dispersivos (diiodometano) da liga Ticp e suas modificações em relação ao ângulo de contato, demonstrando resultados semelhantes para os grupos experimentais em relação a ambos os componentes (polar e dispersivo) (Figura 7).

**FIGURA 7 - Representação gráfica da média da energia livre de superfície em relação ao ângulo de contato para água e diiodometano da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos PADRÃO e TESTE. Os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante em relação aos componentes polar e dispersivo ( $p>0,05$ )**

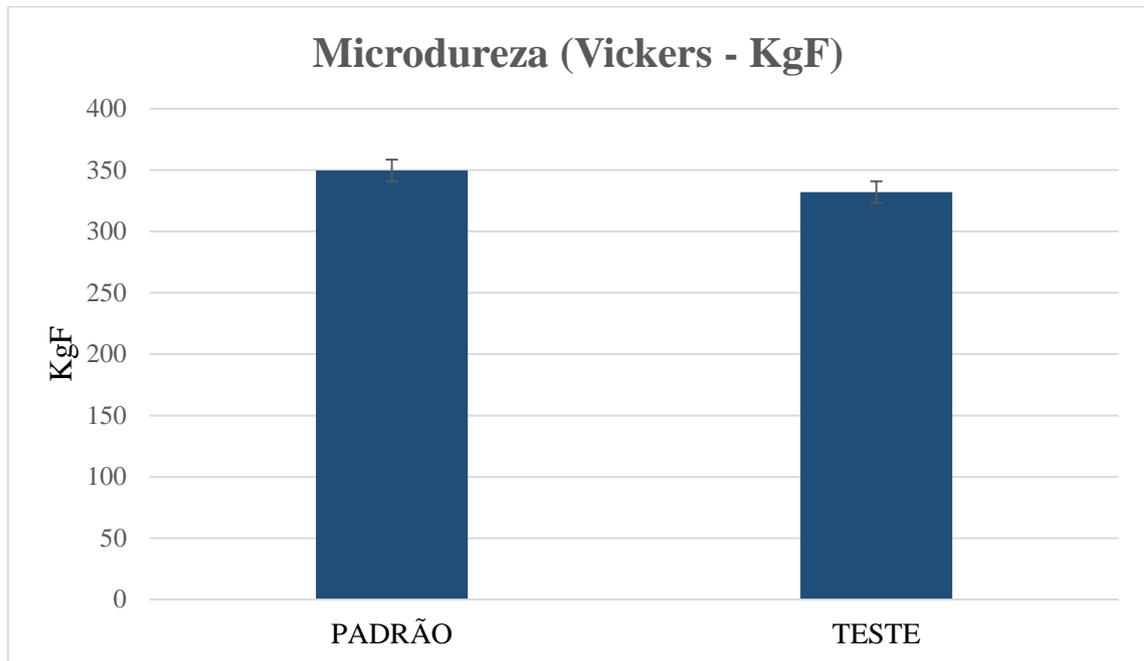


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

#### **4.1.4 Análise de microdureza**

Por meio desta análise foi possível observar uma microdureza semelhante entre os grupos experimentais (Figura 8).

**FIGURA 8 – Representação gráfica da média da microdureza de Vickers da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos PADRÃO e TESTE. Não houve diferenças na propriedade de microdureza entre ambas as superfícies ( $p>0,05$ )**

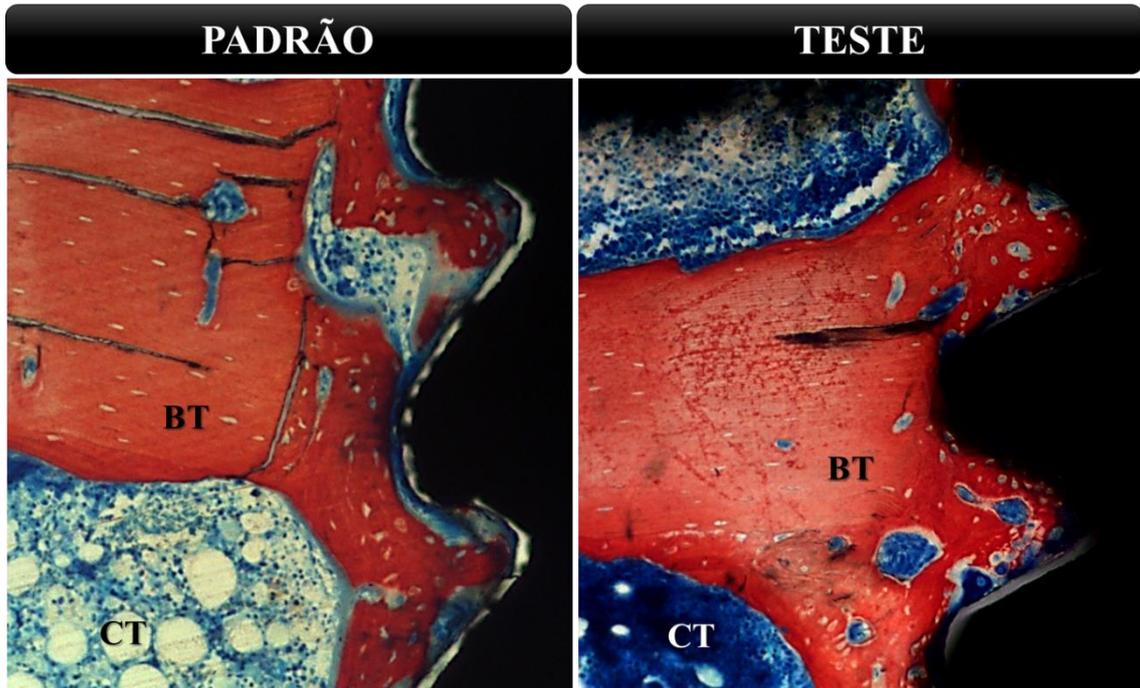


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## 4.2 Histometria

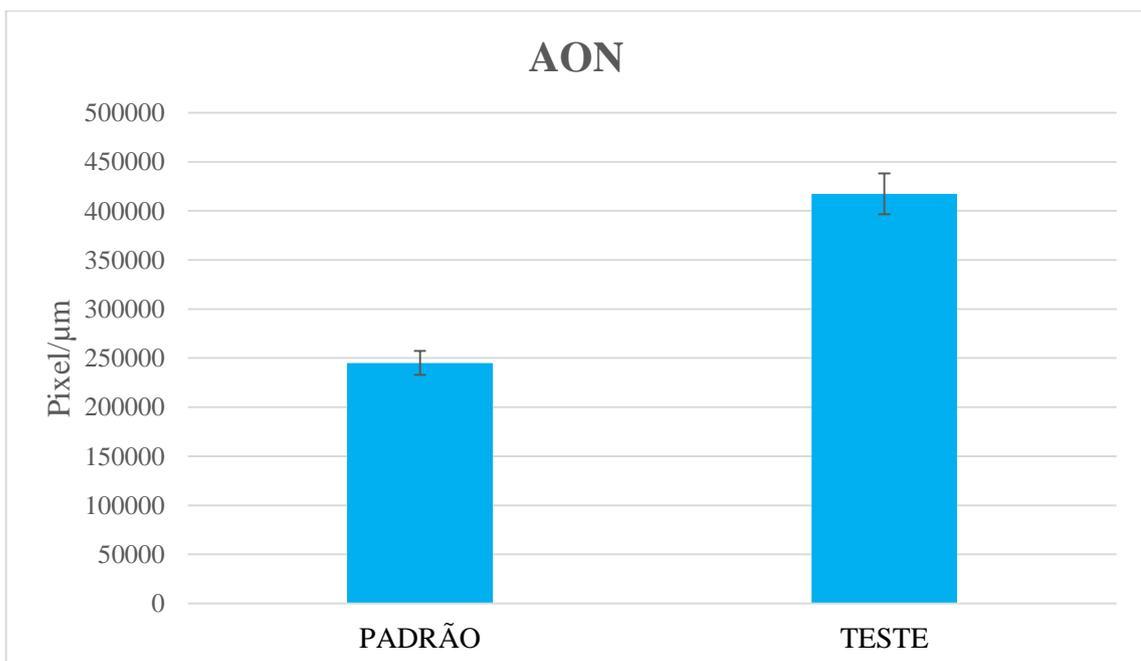
Por meio da análise histométrica (Figura 9) foi possível observar um perfil reparacional mais favorável à osseointegração para o grupo TESTE visto que este apresentou uma Área de osso neoformado (AON) superior quando comparada ao grupo PADRÃO. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,178$ ) (Figura 10). Além disso, no tocante a Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) também foi possível notar uma ligeira superioridade para o grupo TESTE, sem que houvesse diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,691$ ) (Figura 11).

**FIGURA 9 –** Imagens representativas do tecido ósseo nas espiras mais centrais da região periimplantar, observadas durante a análise histométrica (objetiva de 12x). É notável presença de perfil reparacional mais favorável ao grupo TESTE, com menor quantidade de tecido conjuntivo (CT) entremeadado ao tecido ósseo neoformado (BT) comparado ao grupo PADRÃO



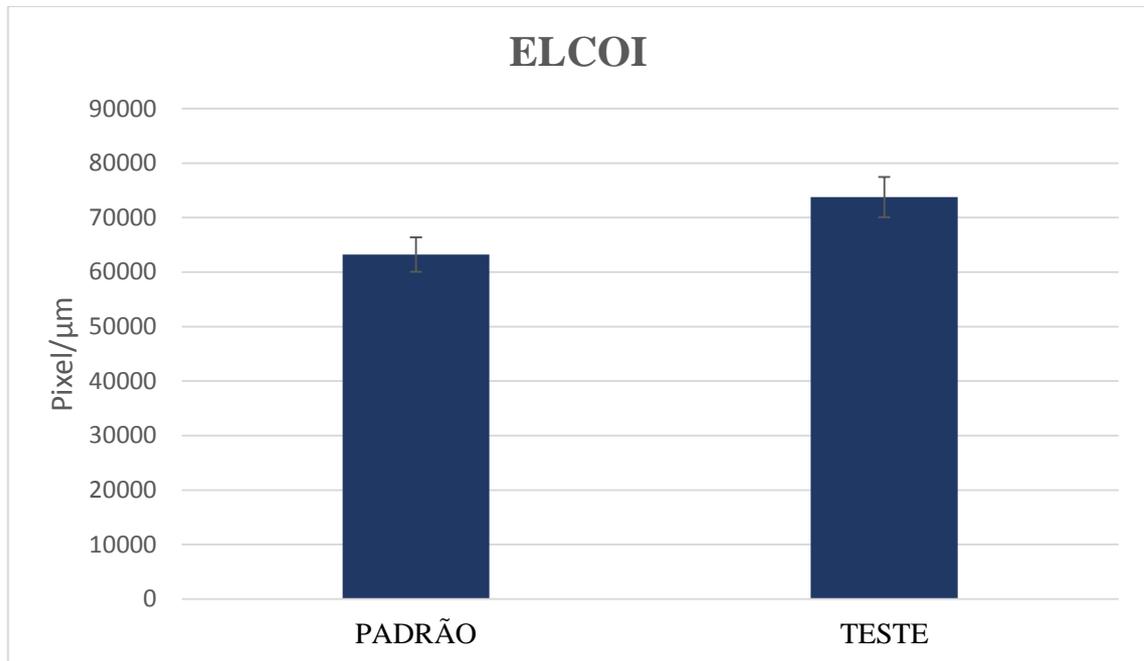
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**FIGURA 10 –** Representação gráfica da análise de Área de Osso Neoformado nas espiras mais centrais da região periimplantar, demonstrando maior neoformação para o grupo TESTE, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,178$ )



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**FIGURA 11 - Representação gráfica da análise de Extensão Linear de Contato Osso/Implante (ELCOI) para os grupos experimentais. Apesar de não haver grandes diferenças na comparação dos resultados de ambos os grupos, nota-se discreta tendência de maior ELCOI para o grupo TESTE ( $p=0,691$ )**

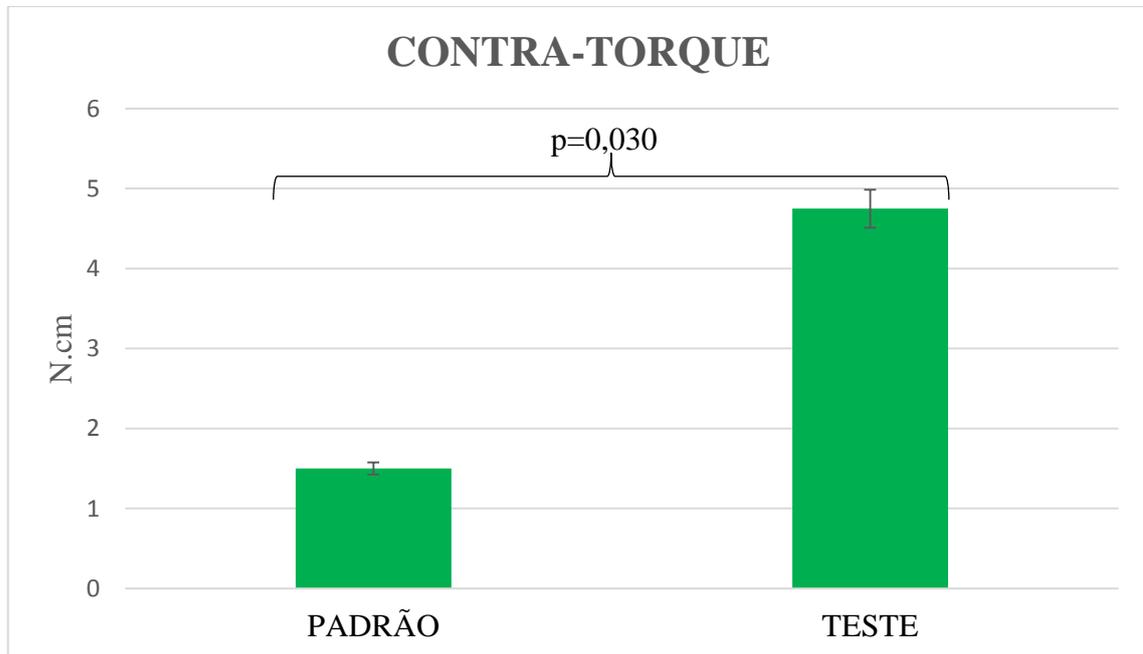


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### **4.3 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)**

A análise biomecânica de contra-torque demonstrou que os implantes tratados por meio do jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE) apresentam um maior pico de torque durante o rompimento da interface osso/implante por meio do torquímetro, com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,030$ ). (Figura 12).

**FIGURA 12 – Representação gráfica da análise biomecânica de contra-torque, realizada por meio de torquímetro digital, evidenciando que para o grupo TESTE foi necessário maior contra-torque até o efetivo rompimento da interface formada entre tecido ósseo e implante ( $p<0,05$ )**

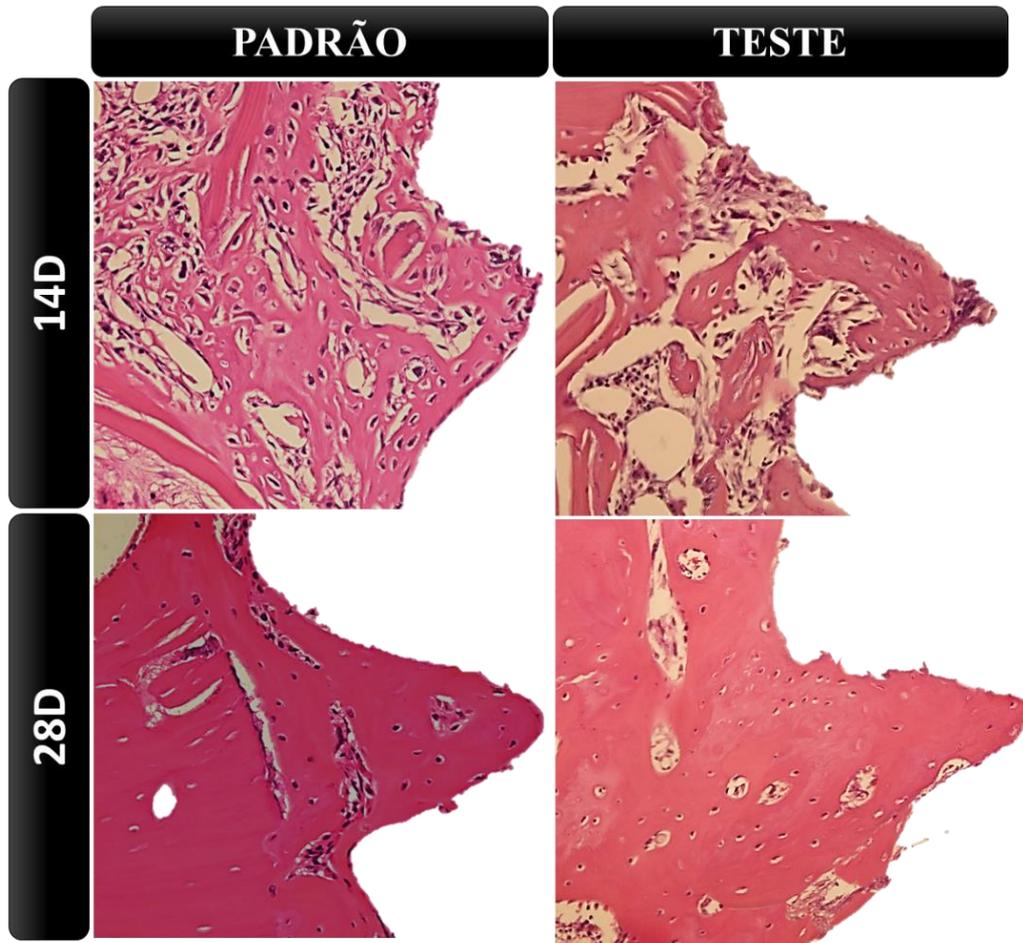


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

#### 4.4 Análise histológica

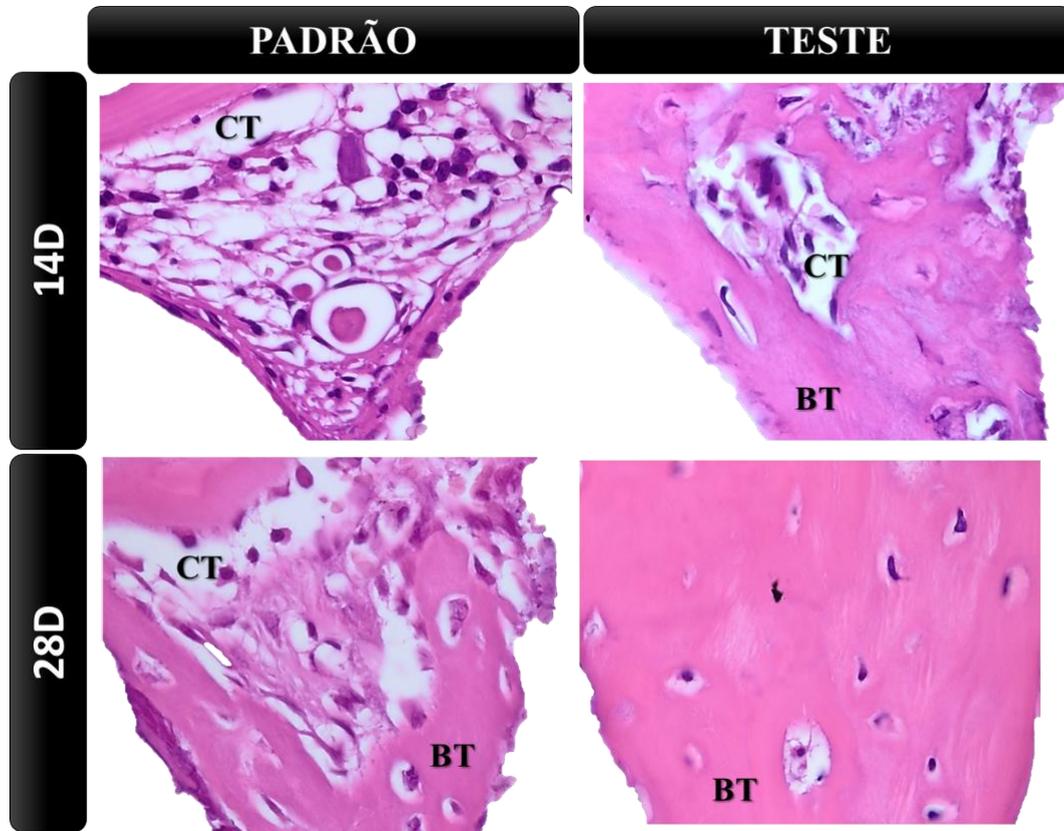
Por meio da análise histológica foi possível observar, em fotomicrografias com objetiva de 20x (Figura 13) e de 100X (Figura 14), as características e o grau de maturação do tecido ósseo das espiras formadas durante a osseointegração dos implantes de ambos os grupos experimentais. Aos 14 dias, foi observado para o grupo PADRÃO um tecido ainda bastante imaturo, com grande quantidade de células e de tecido conjuntivo entremeadado, já para o grupo TESTE, observou-se maior preenchimento por tecido ósseo, com característica de maturação mais avançada e menor quantidade de células. Aos 28 dias, apesar de ambos os grupos demonstrarem uma formação óssea satisfatória, o grupo TESTE apresentou maior destaque por mostrar um tecido ósseo com estrutura mais organizada e madura.

**FIGURA 13 – Fotomicrografias em objetiva de 20x para representação das características do tecido ósseo periimplantar observado por meio da análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina), para ambos os grupos experimentais, aos 14 e 28 dias pós-operatórios. Destaca-se a o perfil mais maduro do tecido ósseo para o grupo TESTE, com menor presença de células e maior quantidade de osso neoformado propriamente dito**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

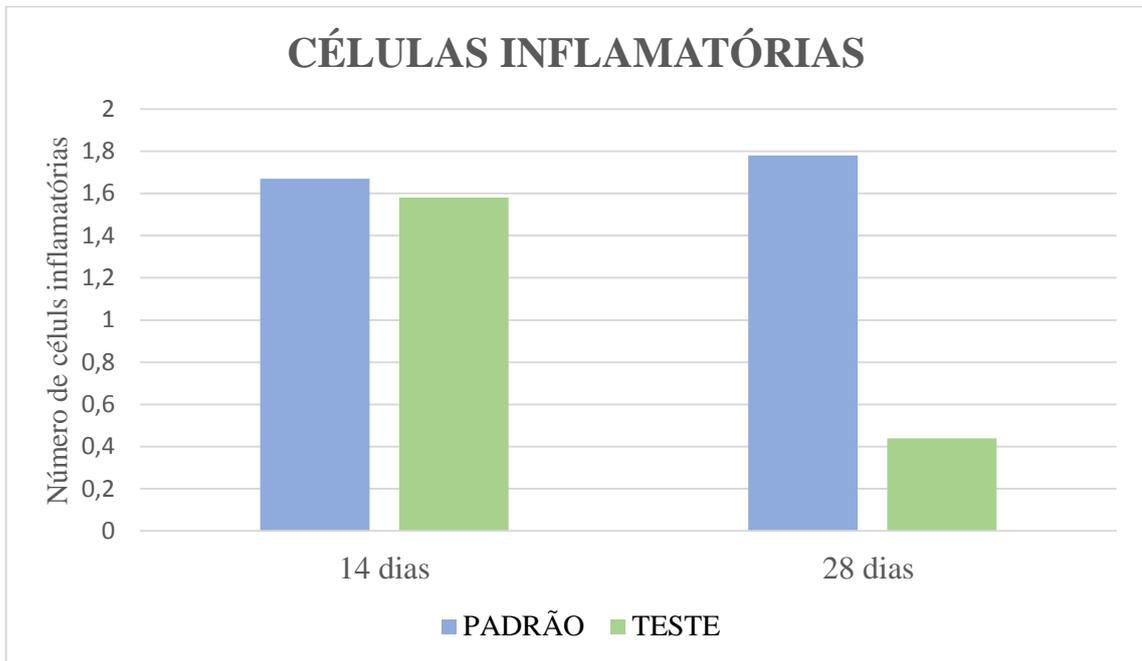
**FIGURA 14 – Fotomicrografias em objetiva de 100x para representação da maturação do tecido ósseo da espira mais central de cada grupo experimental (PADRÃO e TESTE) aos 14 e 28 dias pós-operatório, evidenciando maturação mais avançada para grupo TESTE, com menor quantidade de células e maior neoformação óssea para ambos os tempos experimentais, quando comparado ao grupo PADRÃO**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

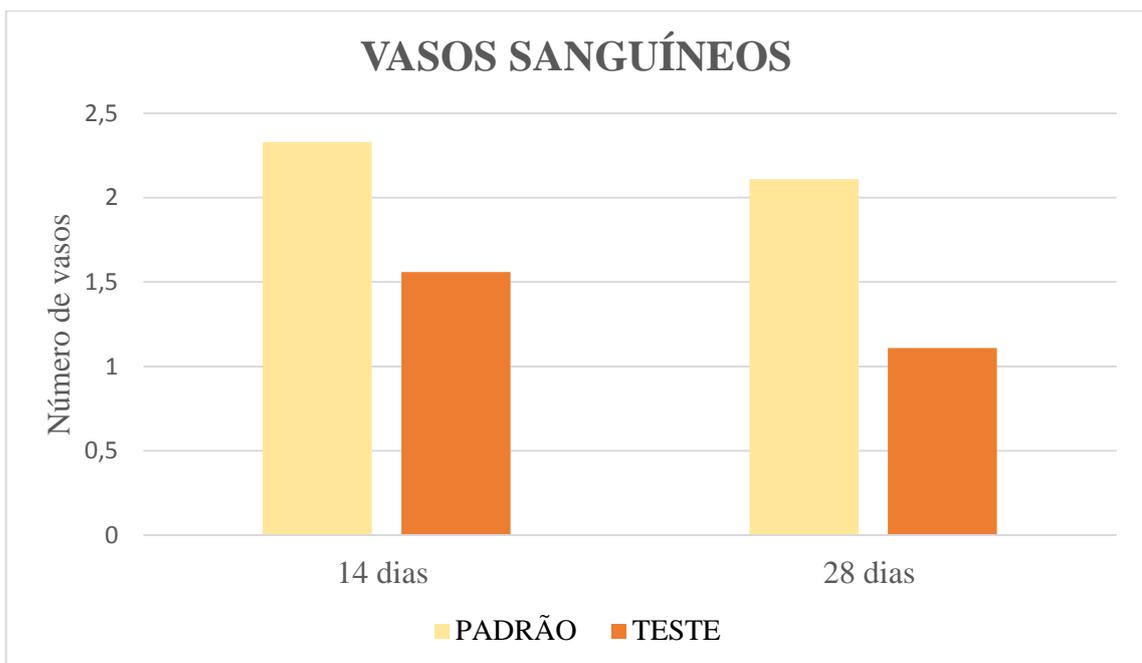
Além disso, esta análise permitiu a verificação do perfil inflamatório relacionado aos grupos experimentais, por meio de fotomicrografias de 100x, em que foram quantificadas as células inflamatórias e os vasos sanguíneos observados nas imagens. Apesar de o grupo TESTE apresentar um menor número de células inflamatórias aos 28 dias pós-operatório, ambos os grupos demonstraram um perfil inflamatório bem similar quanto a presença celular e também quanto a contagem de vasos sanguíneos, reafirmando a biocompatibilidade e ausência de efeito citotóxico em ambas as superfícies utilizadas neste estudo (Figura 15 e 16). Não foram observadas diferenças significativamente estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**FIGURA 15 – Representação gráfica referente a contagem de células inflamatórias em região periimplantar, demonstrando que ambas as superfícies analisadas no estudo não apresentam respostas inflamatórias exacerbadas e efeitos citotóxicos**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**FIGURA 16 – Representação gráfica referente a contagem de vasos sanguíneos em região periimplantar. Os resultados semelhantes para ambos os grupos reforçam a ideia de biocompatibilidade e ausência de efeitos citotóxicos de ambas as superfícies**



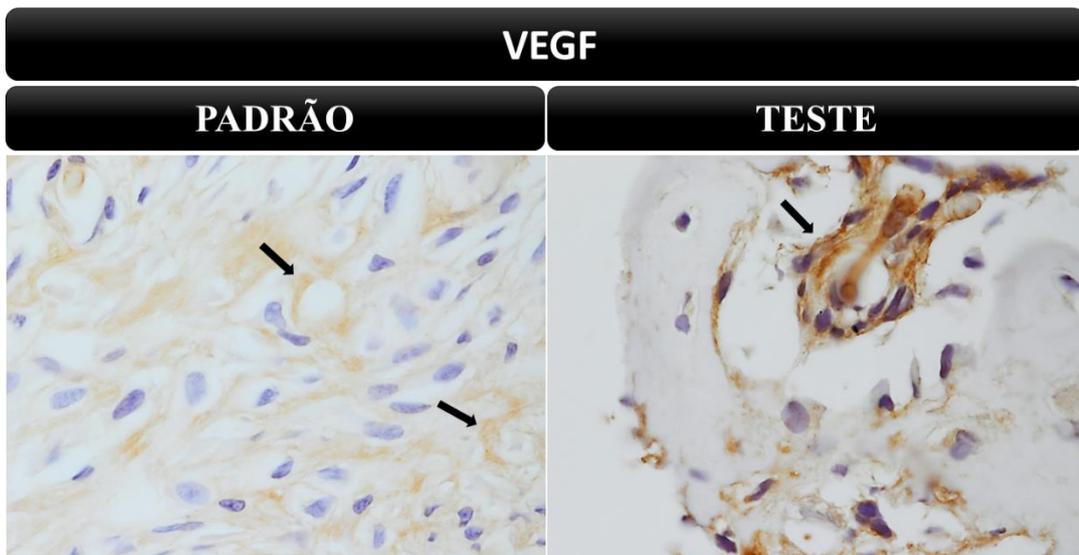
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## 4.5 Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram efetivas para identificar as marcações analisadas nesta proposta. As imunomarcações foram observadas como uma cor amarronzada confinada no citoesqueleto do citosol celular e matriz extracelular para VEGF e do citosol celular para OCN. As figuras 17 e 18 representam o padrão de imunomarcação para os períodos de 14 dias para VEGF e 28 dias para OCN.

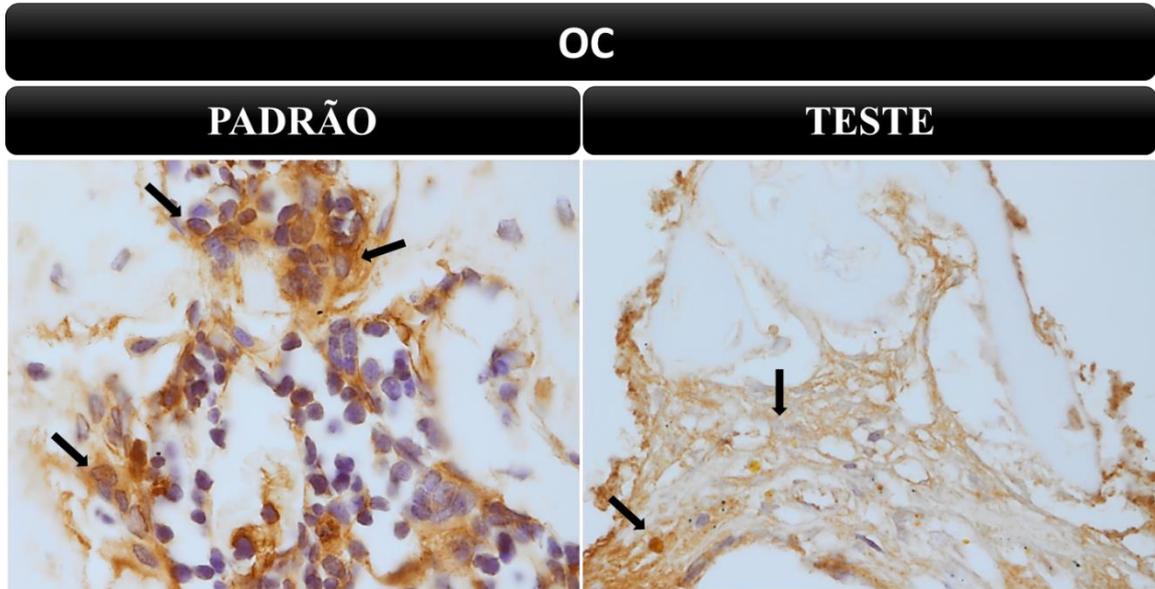
VEGF marcou principalmente fibroblastos, com maior distribuição na maior parte das lâminas no grupo Padrão. OCN marcou osteoblastos de forma similar para ambos os grupos, numa intensidade moderada, com mais de 50% da lâmina com as células coradas.

**FIGURA 17 – Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcação para Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para ambos os grupos experimentais, no período de 14 dias. Nota-se imunomarcação confinada no citoesqueleto do citosol celular e matriz extracelular, que foi discretamente maior para o grupo PADRÃO ( $p>0,05$ )**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**FIGURA 18 – Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcção para Osteocalcina (OCN) para ambos os grupos experimentais, no período de 28 dias. A imunomarcção no citosol celular foi de intensidade moderada e semelhante entre os grupos PADRÃO e TESTE ( $p>0,05$ )**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio deste estudo *in vitro* e *in vivo* foram esclarecedores com relação as propriedades de otimização do reparo ósseo periimplantar relacionados a texturização de superfície por meio do jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo TESTE).

Sabe-se que as técnicas de texturização dos implantes dentários influenciam diretamente no fenômeno de osseointegração atuando desde a diferenciação celular até a formação de matriz óssea calcificada (34). Neste estudo, observou-se que a texturização TESTE foi capaz de alterar as características estruturais da superfície, levando a uma morfologia mais complexa, com presença de inúmeros poros semelhantes a “vulcões” distribuídos homoganeamente pela amostra, o que gera uma maior área de superfície disponível para a interação de proteínas e células da linhagem osteogênica. Concomitante a isso, tem-se um resultado de energia livre de superfície, que apesar de não apresentar diferenças em relação ao grupo PADRÃO, é bastante favorável a adsorção proteica necessária para os estágios iniciais do reparo ósseo. Ainda em relação as características da superfície, se deve pensar nas suas propriedades mecânicas, que também se apresentaram bastante semelhantes aos implantes atualmente já comercializados (PADRÃO) em relação a rugosidade de superfície e microdureza, reforçando a viabilidade da aplicação do tratamento aqui testado nas reabilitações orais implantossuportadas.

Em tais reabilitações, é importante lembrar que as superfícies dos implantes osseointegráveis devem integrar-se com três diferentes tipos de tecidos durante as fases iniciais da cicatrização: epitelial, conjuntivo e ósseo, a fim de que possam, de forma previsível, ser realmente duradouros (35). Diante disso, o perfil inflamatório associado a reparação periimplantar pode ser um preditor do prognóstico relacionado ao tratamento. Neste estudo, ambas as superfícies utilizadas se demonstraram, por meio da análise de células inflamatórias e número de vasos sanguíneos em região periimplantar, aos 14 e 18 dias pós-operatório, com resposta inflamatória compatível com o procedimento cirúrgico, sem capacidade de causar reações teciduais exacerbadas e reação de toxicidade, sugerindo que se tratam de superfícies altamente biocompatíveis.

Com relação a integração inicial do implante com o tecido ósseo, são consideradas mais favoráveis, aquelas superfícies que levam a otimização da série de eventos coordenados necessários para a neoformação óssea periimplantar, que incluem a adsorção proteica, proliferação, diferenciação celular e a deposição de matriz óssea (36). Nesse sentido, por meio da análise histológica, foi possível observar em fotomicrografias com objetiva de 20x e de 100x, que aos 14 dias o grupo PADRÃO apresentava ainda um tecido ósseo bastante imaturo, com grande quantidade de células e de tecido conjuntivo entremeado as regiões de precipitação de matriz óssea, enquanto, para a superfície TESTE havia um maior preenchimento por tecido ósseo, com maturação bem mais avançada. O mesmo se repetiu aos 28 dias, onde TESTE apresentou um tecido ósseo com estrutura mais madura e organizada.

Atrelado a isso, a análise de imunoistoquímica foi efetiva para identificação das marcações propostas. A imunomarcagem para VEGF aos 14 dias discretamente mais intensa para PADRÃO demonstra mais uma vez que o grupo TESTE estava já em uma fase mais avançada do reparo ósseo por meio da redução da expressão desta proteína e conseqüente redução dos vasos sanguíneos na região de reparo. Já em relação a OCN avaliada aos 28 dias pós-operatório, confirma que nesse período, ambos os grupos foram capazes de reparar o osso periimplantar na tíbia de ratas osteoporóticas.

Outro fator de grande importância para o prognóstico e longevidade dos implantes diz respeito a estabilidade primária e secundária, que por sua vez, estão atrelados a qualidade e quantidade óssea disponível (37). Pode-se considerar, a partir dos resultados obtidos por meio desta pesquisa, que a superfície texturizada por meio do jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita tem um perfil mais favorável com relação a estabilidade secundária, visto que durante a realização de análise biomecânica, os implantes com tal superfície apresentam um maior pico de torque durante o rompimento da interface osso/implante, obtido por meio de torquímetro ( $p=0,030$ ). Bons resultados relacionados a estabilidade secundária relacionada a este tratamento também foram observados por outros autores, reforçando positivamente os dados aqui obtidos (38,39).

O resultado favorável associado a análise de contra-torque foi ainda corroborado por meio da histometria, onde, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, houve ocorrência de uma tendência a maior área de osso neoformado (AON) quando comparada ao PADRÃO. O que também foi observado no tocante a extensão linear de contato osso/implante (ELCOI). Esses são achados encorajadores e que atua de acordo com o que já foi postulado na literatura referente a resposta reparacional mais favorável ao jateamento com zircônia comparado ao duplo ataque ácido (40). A incorporação das nanopartículas de hidroxiapatita gera ainda uma superfície com propriedades químicas que mimetizam a composição do tecido ósseo, otimizando a adsorção de proteínas e células da linhagem osteogênica.

Diante dos resultados favoráveis conquistados por meio deste estudo, na busca por meios alternativos que otimizem o reparo ósseo especialmente em situações críticas, como em condições sistêmicas de pobre resposta metabólica óssea, tem-se que a texturização por jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita é um tratamento promissor, contando com a capacidade de alterar a morfologia e composição química da superfície de implantes, com aceleração da maturação do tecido ósseo e grande influência positiva na estabilidade secundária dos implantes osseointegráveis.

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que, o jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita utilizado para modificação da superfície dos implantes osseointegráveis foi favorável ao reparo ósseo periimplantar, sendo importante a realização de mais estudos que reforcem tais resultados para a consolidação clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Steinemann SG. Titanium: the material of choice? *Periodontology 2000*. 1998;17(1):7–21. doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00119.x
2. Wälivaara B, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Tengvall P. Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*. 1994;15(10):827-34. doi: 10.1016/0142-9612(94)90038-8
3. Chai WL, Razali M, Moharamzadeh K, Zafar MS. The hard and soft tissue interfaces with dental implants. In: Zafar MS, Khurshid Z, Khan AS, Najeeb S, Sefat F, editors. *Dental implants*. Woodhead Publishing; 2020. p. 173–201. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012819586400010X>
4. de Bruyn H, Christiaens V, Doornewaard R, Jacobsson M, Cosyn J, Jacquet W, et al. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontology 2000*. 2017;73(1):218–27. doi: 10.1111/prd.12177
5. Hatamleh MM, Wu X, Alnazzawi A, Watson J, Watts D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dental Materials*. 2018;34(4):676–83. doi: 10.1016/j.dental.2018.01.016
6. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed Research International*. 2015;2015:791725. doi: 10.1155/2015/791725
7. Ivanoff C-J, Widmark G, Hallgren C, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical Oral Implants Research*. 2001;12(2):128–34. doi: 10.1034/j.1600-0501.2001.012002128.x
8. Tavares MG, Tambasco de Oliveira P, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research*. 2007;18(4):452–8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01344.x
9. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research*. 2004;83(7):529–33. doi: 10.1177/154405910408300704
10. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(suppl.4):172–84. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x

11. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, Duerselen L, Kampschulte M, Lips K, et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. 2014;45(3):487–93. doi: 10.1016/j.injury.2013.10.033
12. Oliveira N, Guastaldi F, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2013;15(3):427–37. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00354.x
13. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*. 2013;24(8):896–903. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02471.x
14. Zechner W, Tangl S, Fürst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(2):150–7. doi:10.1034/j.1600-0501.2003.140203.x
15. Faverani LP, Assunção WG, de Carvalho PSP, Yuan JC-C, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching. *PLOS ONE*. 2014;9(3):e93377. doi:10.1371/journal.pone.0093377
16. Faverani LP, Barao VAR, Pires MFA, Yuan JC-C, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;43:1–10. doi: 10.1016/j.msec.2014.06.033
17. Barão VAR, Ricomini-Filho AP, Faverani LP, del Bel Cury AA, Sukotjo C, Monteiro DR, et al. The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;56:114–24. doi: 10.1016/j.msec.2015.06.026
18. Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research*. 2006;85(7):584–95. doi: 10.1177/154405910608500703
19. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research*. 2006;85(7):596–607. doi: 10.1177/154405910608500704

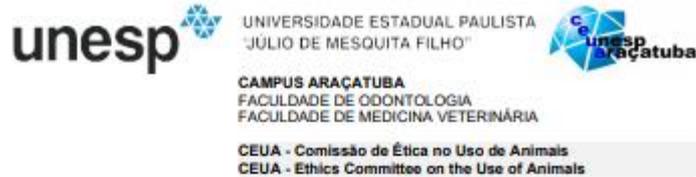
20. Rendina E, Hembree KD, Davis MR, Marlow D, Clarke SL, Halloran BP, et al. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. *PloS One*. 2013;8(3):e60569. doi: 10.1371/journal.pone.0060569
21. Hurst D. Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure. *Evidence-Based Dentistry*. 2014;15(4):102–3. doi: 10.1038/sj.ebd.6401057
22. Chrcanovic BR, Custódio ALN. Mandibular fractures associated with endosteal implants. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;13(4):231–8. doi: 10.1007/s10006-009-0171-7
23. LeRoith D. Foreword. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2012;41(4):xi–xiii. doi: 10.1016/j.ecl.2012.08.005
24. Rapaport R. Preface. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2012;41(4):xv–xvi. doi: 10.1016/j.ecl.2012.08.006
25. Faverani LP, Barão VAR, Ramalho-Ferreira G, Ferreira MB, Garcia-Júnior IR, Assunção WG. Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*. 2014;102(1):22–30. doi: 10.1002/jbm.b.32949
26. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 2015;20(3):38003. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.038003
27. Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2010;25(3):516–24.
28. Harrasser N, Gorkotte J, Obermeier A, Feihl S, Straub M, Slotta-Huspenina J, et al. A new model of implant-related osteomyelitis in the metaphysis of rat tibiae. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;17:152. doi: 10.1186/s12891-016-1005-z
29. Kuchler U, Luvizuto ER, Muñoz F, Hofbauer J, Watzek G, Gruber R. Bone healing around titanium implants in two rat colitis models. *Clinical Oral Implants Research*. 2013;24(2):224–9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02454.x
30. Barão VAR, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC-C, Wimmer MA, Sukotjo C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. *Clinical Oral Implants Research*. 2012;23(9):1055–62. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02265.x

31. Lara Rodriguez L, Sundaram PA, Rosim-Fachini E, Padovani AM, Difffoot-Carlo N. Plasma electrolytic oxidation coatings on  $\gamma$ TiAl alloy for potential biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2014;102(5):988–1001. doi: 10.1002/jbm.b.33079
32. Faverani LP, Barao VAR, Pires MFA, Yuan JC-C, Sukotjo C, Mathew MT, et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti–6Al–4V alloy subjected to different mouthwash solutions. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;43:1–10. doi: 10.1016/j.msec.2014.06.033
33. Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dental Materials*. 2004;20(3):262–8. doi: 10.1016/S0109-5641(03)00102-7
34. Thakral G, Thakral R, Sharma N, Seth J, Vashisht P. Nanosurface - the future of implants. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(5):ZE07-10. doi: 10.7860/JCDR/2014/8764.4355
35. Louropoulou A, Slot DE, van der Weijden F. Influence of mechanical instruments on the biocompatibility of titanium dental implants surfaces: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*. 2015;26(7):841–50. doi: 10.1111/clr.12365
36. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *Journal of Periodontology*. 2003;74(7):945–56. doi: 10.1902/jop.2003.74.7.945
37. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*. 2003;67(8):932–49. doi: 10.1002/j.0022-0337.2003.67.8.tb03681.x
38. Bacchelli B, Giavaresi G, Franchi M, Martini D, de Pasquale V, Trirè A, et al. Influence of a zirconia sandblasting treated surface on peri-implant bone healing: An experimental study in sheep. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(6):2246–57. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.024
39. Franchi M, Orsini E, Trire A, Quaranta M, Martini D, Piccari GG, et al. Osteogenesis and morphology of the peri-implant bone facing dental implants. *TheScientificWorldJournal*. 2004;4:1083–95. doi: 10.1100/tsw.2004.211
40. Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, de Pasquale V, Martini D, Fini M, et al. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *Journal of Periodontology*. 2007;78(5):879–88. doi: 10.1902/jop.2007.060280



# ANEXOS

## ANEXO A – Comitê de Ética



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da atividade antimicrobiana, comportamento eletroquímico e osteogênico em superfícies de Tícp texturizadas por métodos experimentais envolvendo jateamento de zircônia, ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita**", Processo FOA nº 00528-2018, sob responsabilidade de Wirley Gonçalves Assunção apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Novembro de 2018.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 13 de Outubro de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 13 de Novembro de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of antimicrobial activity, electrochemical, and osteogenic behavior in Tícp surfaces textured by experimental methods involving zirconia blasting, acid etching and addition of hydroxyapatite nanoparticles**", Protocol FOA nº 00528-2018, under the supervision of Wirley Gonçalves Assunção presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 13, 2018.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** October 13, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** November 13, 2021.

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: [ceua@fca.unesp.br](mailto:ceua@fca.unesp.br)

**ANEXO B – Normas para publicação na Revista Clinical Oral Implants Research.****1. GENERAL**

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Clinical Oral Implants Research. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

## 2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

### 2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3)

final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

## 2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

### 2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

### 2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

## 2.5 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

## 2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## 2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement must be sent before any manuscript can be published. Authors must send the completed

Copyright Transfer Agreement upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Copyright Transfer Agreement at submission. Please return your completed form to:

### 3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: [coir@zmk.unibe.ch](mailto:coir@zmk.unibe.ch)

#### 3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.

- If you are creating a new account.
  - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select Corresponding Author Center.

### 3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

### 3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research will be reviewed by two experts in the field. Clinical Oral Implants Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### 3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

### 3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### 3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server ([uranus.scholarone.com](mailto:uranus.scholarone.com)) to their whitelist.

### 3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication. Treatment rational by experts with evidence-based treatment

approach. Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

### 5.2. Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

## 5.2. Structure

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

**Introduction:** Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

**Material and Methods:** Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

**Results:** Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

**Discussion:** Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

**Main Text of Short Communications:** Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

**Acknowledgements:** Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

### 5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

c) The title of the paper should be included, without quotation marks

f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: [www.endnote.com/support/enstyles.asp](http://www.endnote.com/support/enstyles.asp) . Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

#### 5.4. Tables, Figures and Figure Legends

**Tables:** Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

**Figures:** All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without

reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## 6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

### 6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from

this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

## 6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Clinical Oral Implants Research is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI),

which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### 6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register

and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including.