WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA

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

Araçatuba – SP

2019

WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA

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

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coorientadora: Profª. Associada Roberta Okamoto

Araçatuba – SP

2019

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586c

Silva, William Phillip Pereira da.

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

122 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

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

Black D7

CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida:

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

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

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

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

Agradecimentos especiais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus padrinhos e tios, **Nilza Maria Pereira da Silva e Carlos Francisco Costa** obrigado pelo amor e apoio de vocês, meus "segundos pais", essa conquista são seria possível sem vocês.

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

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

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Epígrafe

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

(Albert Einstein)

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

Listas

Lista de Figuras

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

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

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

Figura 46 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. 88
Figura 47 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo OVX AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve a moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho. 88
Figura 48- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. 89
Figura 49 -Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. 90
Figura 50- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho. 90
Figura 51 - Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho. 91
Figura 52 – Imagem representativa da reconstrução obtida pela microtromografia. (A) Reconstrução; (B) Corte medial do implante; (C) Seleção da região de interesse (ROI); (D) Implante com área de osso neoformado após seleção do ROI; (E e F) Área de osso neoformado analisado. 93
Figura 53 - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos: Bv.Tv (porcentagem do volume ósseo) e Po(tot) (porcentagem da porosidade total). 94
Figura 54 - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos. (a)Tb.Th; (b)Tb.Sp; (c) Tb.N 95
Figura 55 - Análise de Torque reverso: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (N.cm) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). 96
Figura 56 - Imagem da microscopia confocal à laser dos grupos experimentais. 97
Figura 57 – Área de Fluorocromos - Calceína: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). 98
Figura 58 - Área de Fluorocromos - Alizarina: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). 99
Figura 59 - Análise de Fluorocromos: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) na comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). 100
Figura 60 – Taxa de aposição mineral (MAR – mineral apposition rate): Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel/dia) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). 101
Figura 61 – Imagens dos grupos experimentais para análise histométrica. 103

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

Lista de Abreviaturas

AC= Texturização por Duplo Ataque Ácido e jateamento

ALP = Fosfatase alcalina

AON = Área de osso neoformado

α-MEM = Meio essencial mínimo

BSP= Sialoproteína óssea

BV/TV = Percentual de volume ósseo

CTM-MO= Células tronco mesenquimais de medula óssea

CA= Fosfato de Cálcio

EDS= Espectroscopia de energia dispersiva

ELCOI= Extensão linear de contato ósseo com a superfície do implante

HE= Hematoxilina e Eosina

MAR= Mineral apposition rate – taxa de aposição mineral

MEV= Microscopia Eletrônica de Varredura

MTS= Meio total suplementado

OC= Osteocalcina

OPG = Osteoprotegerina

OPN = Osteopontina

OVX= Ratas ovariectomizadas

P= Fósforo

PEO = Texturização por Oxidação por Plasma eletrolítico

Po.Tot = Total porosity

ROI = Região de interesse

RANKL = Receptor ativador do fator nuclear K beta ligante

RUNX2 = Runt-related transcription fator 2

SHAM= Ratas submetidas à cirurgia ficcional não ovariectomizadas

SP7 OU OSX = Fator de transcrição 7 ou Osterix

Tb.Th = Trabecular thickness – espessura do trabéculo ósseo

Tb.Sp = Trabecular space – separação das trabéculas ósseas

Tb.N = Trabecular number – número de trabéculas ósseas

Ti= Titânio

Ticp= Titânio comercialmente puro

Ti-6Al-4V= Liga Titânio – Alumínio - Vanádio

TRAP = Fosfatase resistente ao tartarato

Introdução

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Objetivos

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

Materiais e métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Estudo *in vitro*

Caracterização estrutural "*baseline"*

No período de caracterização estrutural *baseline*, três discos e implantes de cada superfície: sem texturização de superfície (Usinado/Controle), com texturização por duplo ataque ácido (AC) e com texturização de superfície com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização da superfície e a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliação da composição química dos tratamentos.

Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de 1 μm^3) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies da liga de Ti, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. 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 [42].

Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico

Os implantes de Ti-6Al-4V fornecidos pela empresa Emfils Implantes Odontológicos (Itu, São Paulo, Brasil), com as dimensões de 2 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento, assim como os discos da mesma liga (Ti-6Al-4V) com as dimensões de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, com superfície usinada foram tratados em um reator, acionado por um sistema elétrico composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação alternada com tensão de saída variável, um transformador, um circuito de retificação, um disjuntor, um amperímetro e um voltímetro. Um osciloscópio foi utilizado para verificar a forma da onda após a retificação. O sistema de processamento é composto pelo porta-eletrodos e a cuba eletrolítica.

Através do sistema elétrico, os eletrodos foram alimentados com tensão DC de até 1000 V e corrente máxima de 1,5 A. Um variador de tensão AC, acoplado na fonte permite o ajuste no valor desejado de tensão. No decorrer do tratamento, a temperatura da solução

eletrolítica foi medida com um termômetro portátil. Os parâmetros de oxidação são a densidade de corrente de 50 mA/cm^2 e tensão 250-400 V. O tempo de oxidação foi de 5 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C.

A solução eletrolítica foi preparada dissolvendo $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, $NH_4H_2PO_4$ (3,6 x 104 M) em 1L de água destilada, com relação molar sendo 1.67, a fim de promover a incorporação de diferentes íons na superfície especificada, com deposição de cálcio e fósforo durante 10 minutos [29, 30]. (Fig. 1)



Figura 1*- Sistema integrado para criação de faíscas elétricas (MAO) através da oxidação por plasma eletrolítico e incorporação pela técnica biomimética de íons*

cálcio e fosfato (Procedimento realizado na Faculdade de Engenharia – UNESP Sorocaba-SP).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Plasma Tecnológico da Faculdade de Engenharia da UNESP de Sorocaba e analisou a caracterização da superfície dos discos e implantes de Ti-6Al-4V com superfície USINADA, AC e texturizada por PEO (grupo teste). A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a composição química dos tratamentos de superfície. Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de 1 μm^3) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies dos implantes, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. 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.

Energia livre de superfície e ângulo de contato

A análise da energia livre de superfície foi realizada somente nos discos AC e PEO e mensurada de acordo com o protocolo sugerido por [43] 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 ± 1 °C e umidade controlada (Figura 2).

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 [43].

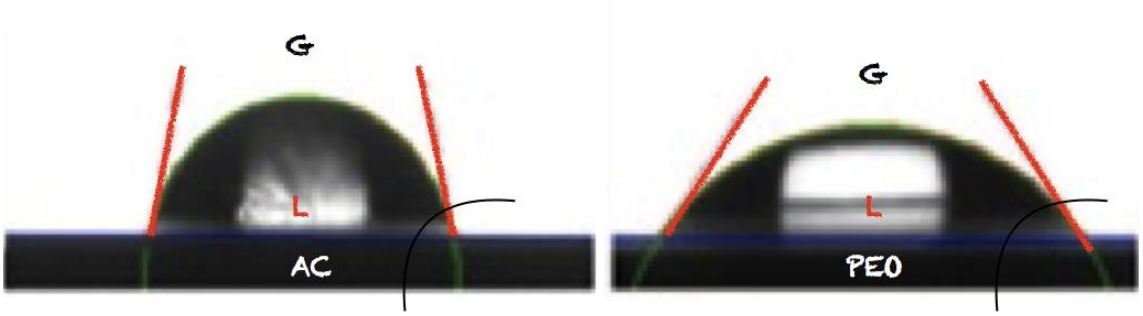


Figura 2 *- Imagem ilustrativa demonstrando o ângulo de contato criado entre a água (L) com a superfície (AC / PEO) em relação ao ar (G).*

Perfilometria (Rugosidade de superfície)

A análise de rugosidade de superfície (Ra - média aritmética) foi mensurada nos grupos AC e PEO 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 Ti-6Al-4V e a média calculada [44].

3.2. Estudo Animal (*ex-in vivo e in vivo*)

Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – FOA/UNESP, o qual apresentou aprovação por meio do parecer número 01040-2016 (Anexo 1).

Para a realização do estudo, foram utilizadas 57 ratas Wistar (*Rattus novergicus*) sendo 38 ratas com 6 meses de idade (Grupos OXV e SHAM) e 19 ratas senis (18 meses de idade: Grupo SENIL), divididas para realização do estudo *ex-in vivo* (n=48) e *in vivo* (n=9), com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável (22 ± 2° 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.

Indução de osteoporose

Assim, 38 ratas jovens adultas com 6 meses de idade (Rattus novergicus albinus Wistar), fêmeas, foram aleatoriamente divididas em dois grupos (n=16 por grupo *in vivo* e 3 por grupo *ex-in vivo*) previamente determinadas (SHAM e OVX), para a indução da osteoporose através da técnica de ovariectomia bilateral, simulando pacientes entre 25 e 30 anos de idade [45, 46] que já apresentam deficiência de estrógeno, hipogonadismo ou até mesmo que fizeram a cirurgia para histerectomia.

As ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral (grupo OVX). Estas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) na dosagem de 50 mg/kg e Cloridrato de Ketamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dosagem de 5 mg/kg e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, e foi 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, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e então laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl^{tm} – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Nesta etapa os ovários foram removidos. O próximo passo caracterizou-se pela sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl^{tm} – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) nos planos mais profundos e fio Nylon 4-0 (Ethicon^{tm} – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) no plano superficial (Figura 3). As ratas do grupo saudável (osso de densidade normal: SHAM) passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos chifres uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção. A realização da medicação pós-operatória imediata, de acordo com o comitê de ética, foi aplicada Dipirona Sódica 500 mg/kg de peso, intramuscular, dose única e antibioticoterapia profilática com Pentabiótico 0,1mg/kg do peso do animal, dose única, intramuscular.

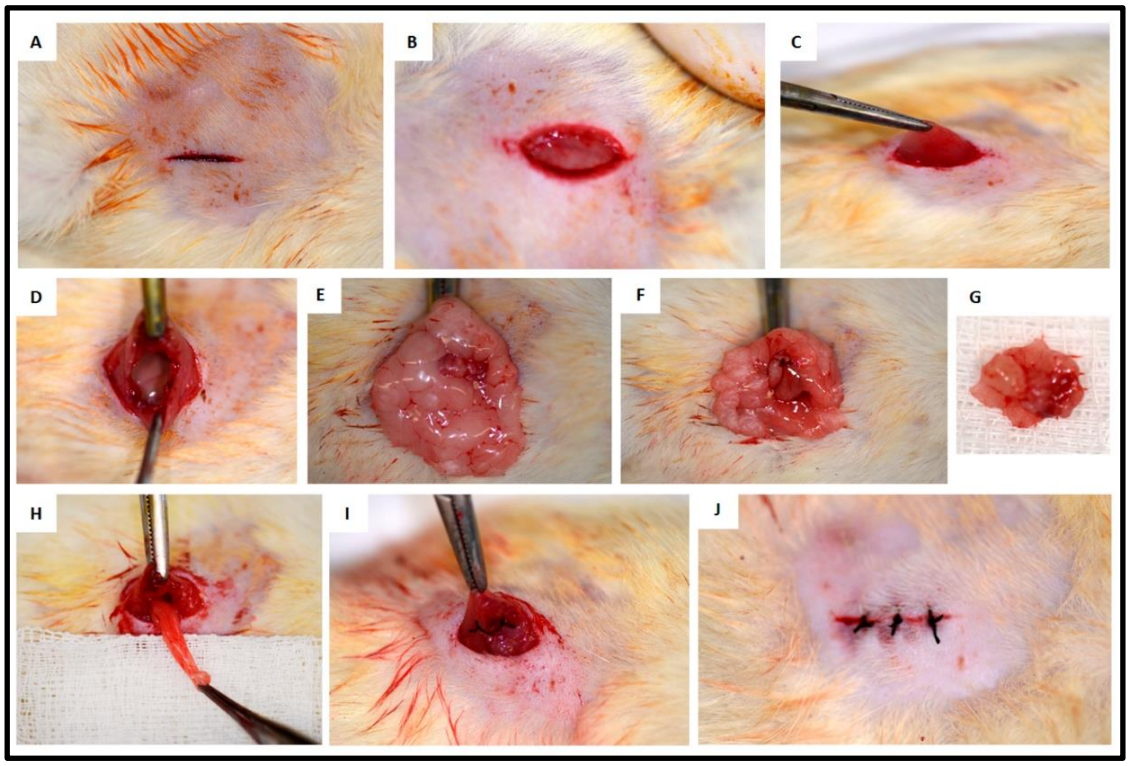


Figura 3 - *Imagens demonstrativas do procedimento de ovariectomia: (A) Incisão da pele; (B) acesso ao plano interno; (C) divulsão da camada abdominal; (D) acesso a cavidade abdominal; (E) exposição do chifre uterino e tecido adiposo; (F) Laqueadura do chifre uterino; (G) ovário removido; (H) reintrodução do conteúdo abdominal para o interior da cavidade abdominal; (I) Sutura do plano muscular interno; (J) Sutura do plano externo.*

Todos os animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água ad libitum, aguardando por mais 90 dias após ovariectomia, que segundo a FDA americana, é o período que contempla a instalação da osteoporose em ratas.

Passados 90 dias da indução da osteoporose em ratas jovens adultas (SHAM e OVX) e 10 dias após a ambientalização das ratas senis no biotério (SENIL), os animais foram submetidos à eutanásia (ex *in vivo*) e a instalação de implantes (*in vivo*).

Para a confirmação da osteoporose, 6 animais de cada grupo foram sedados e submetidos à decapitação através de “guilhotina” para coleta de sangue, para a dosagem sérica de estógeno (Estradiol – ng/mL), através do método ELISA.

Imunoensaio para dosagem de estrógeno

A concentração de estrógeno para as ratas dos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL, foi determinada pelo método de ELISA - enzima imunoensaio. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços foram recobertos e incubados com o anticorpo anti-estradiol durante 15-18h a 4ºC. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA), em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo a seguir, incubada com os padrões e as amostras de plasma em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotinilado à 25ºC. A placa foi lavada, o conjugado Streptavidina-HRP foi adicionado e submetido à agitação (300 rpm) à 25ºC. A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina). O tampão "*stop*" foi adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante.

3.2.1 Estudo *ex-in vivo*

Passados 90 dias da indução da osteoporose nas 6 ratas jovens adultas (SHAM e OVX) e 10 dias após a ambientalização das ratas senis no biotério (SENIL), foram submetidos à eutanásia através da sobredosagem anestésica com associação de tiopental sódico (150mg por kg de peso) e lidocaína (10mg por ml) pela via intraperitoneal, seguida da antissepsia da pele em região de fêmur do animal, os fêmures foram removidos através de tesouras estéreis e lâminas de bisturi.

Os procedimentos do estudo ex-*in vivo* foram realizados no laboratório de biologia celular da Faculdade de Odontologia, da Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto - SP.

Isolamento e cultura de células

Os fêmures retirados foram transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α-MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500 µg/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 µg/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies) [47-50].

No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea extraída (Figura 4) por irrigação com meio de crescimento (condição não indutora de diferenciação celular) contendo α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 µg/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies).

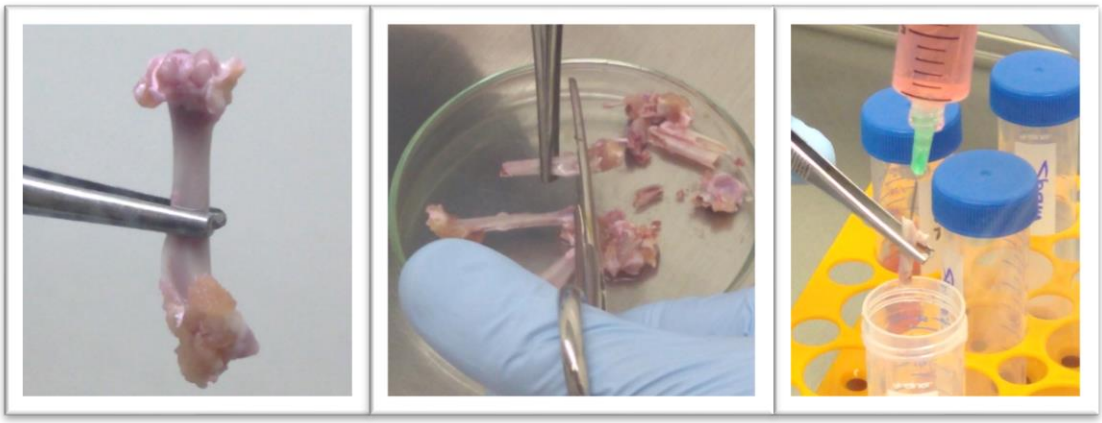


Figura 4 *– Imagem passo a passo da extração da medula óssea do fêmur.*

As células da medula óssea foram cultivadas em meio de crescimento em garrafas de 75 cm^2 (Corning Incorporated, EUA) por 7 dias para permitir a seleção das células tronco mesenquimais de medula óssea (CTMs-MO), por aderência ao poliestireno, e a expansão das mesmas. As culturas foram mantidas a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, sendo realizado as trocas do meio de cultura 3 vezes por semana.

Plaqueamento das células sobre os discos de Titânio

Após a expansão e obtenção do número de CTMs-MO, foi realizado a remoção dos meios de crescimento das garrafas e submetidas ao processo de lavagem com 20 ml de PBS filtrado aquecido, por 3 vezes. As células foram tripnizadas das garrafas por meio da solução de tripsina (9,5ml) com EDTA filtrado (500 µl) e colagenase (500 µl), com a permanecia das garrafas na incubadora por 15 minutos, sendo após esse período, realizado a inativação da enzima com 5 ml de MTS 10% (Meio Total Suplementado) e sendo confirmado o desprendimento das células através da visualização por microscópio. As células foram colocadas em tubos para a centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, e

após a remoção do sobrenadante, foram ressuspendidas, homogenizadas e contadas na câmara de Newbauer (hemocitômetro).

Os discos de titânio esterilizados, foram separados e colocados em placas de poliestireno de 24 poços, sendo organizado na primeira fileira os discos do grupo Controle (superfície usinada), na segunda fileira o Grupo AC (superfície tratada com ataque ácido e jateamento), terceira fileira o Grupo PEO (grupo experimental) e a quarta fileira as células foram colocadas diretamente no plástico, sem a presença de discos de titânio, para o controle diário (Figura 5). As células cultivadas de todos os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) foram plaqueadas em cima dos discos de titânio, com 1,8ml de MTS 10%, juntamente com a concentração de células de acordo com cada analise a serem realizadas.

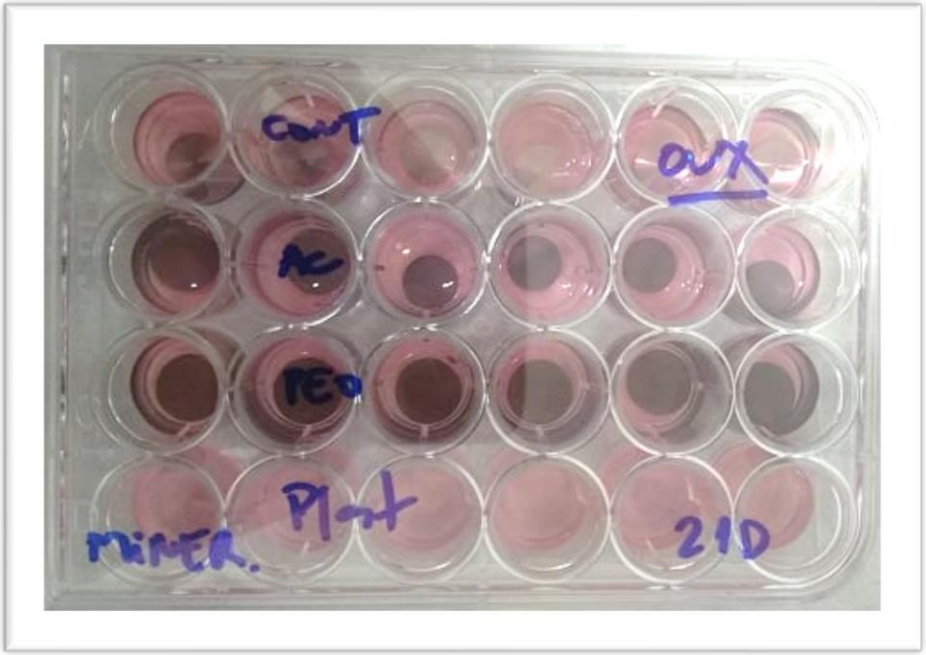


***Figura 5** – Imagem representativa do plaqueamento das células nos discos.*

Crescimento e Viabilidade Celular

Para a avaliação do crescimento e viabilidade celular, foram plaqueadas uma concentração de $2x10^4$ células por disco, sendo utilizados 4 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO), para os períodos de 3, 7 e 10 dias. Durante os períodos testes, as células foram separadas enzimaticamentes dos discos por meio da solução de tripsina (9,5ml) com EDTA filtrado (500 µl) e colagenase (500 µl). O número total de células e a porcentagem de viáveis e não viáveis foram determinadas através do método

da coloração em azul de Trypan (Sigma, St.Louis, MO, USA) (Figura 6) e analisadas, a absorbância foi lida a 570nm no leitor de placas μQuant (Bio-Tek Instruments Inc.) e os dados foram expressos como absorbância.

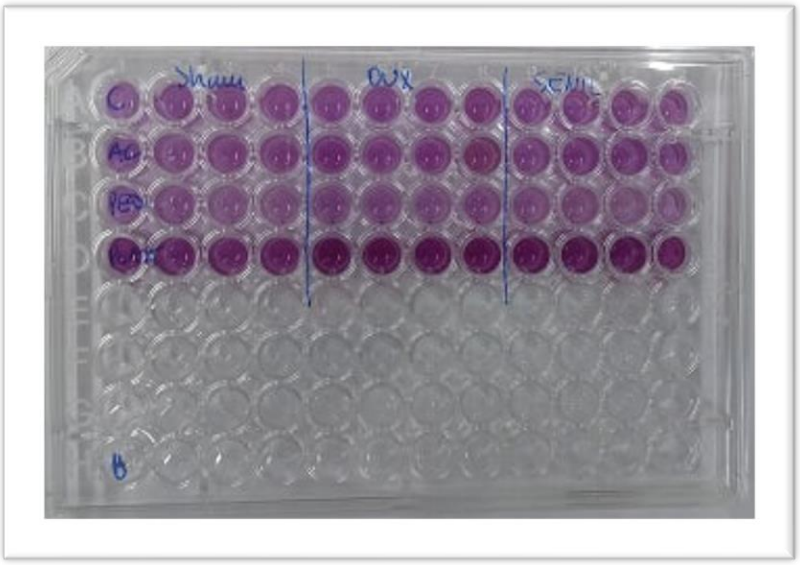


Figura 6 - *Imagem representativa após remoção das células dos discos para avaliação.*

Análise por PCR em tempo real

Para a análise, foram plaqueadas uma concentração de $2x10^4$ células por disco, sendo utilizados 12 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO). No período do 7º dia, a quantificação da expressão gênica dos marcadores ósseos através da: *runt-related transcription fator 2* (RUNX2), fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica; Fator de transcrição 7 ou Osterix (SP7 ou OSX) fator de transcrição essencial para diferenciação terminal de osteoblastos e formação óssea; Fosfatase Alcalina (ALP) enzima para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular; Sialoproteína óssea (BSP) proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita; Osteocalcina (OC) proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros; e Osteopontina (OPN) proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização [51-54].

Foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit SV *Total RNA Isolation System* (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o

RNA total será quantificado a partir de 1 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Esse procedimento será feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III *First Strand Synthesis Systems* (Invitrogen-Life Technologies). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) no aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em duplicata com volume final de 10 µL contendo 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/µL de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) e os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β-Actina e calibrados pelo grupo Controle.

Análise por imunofluorescência

Para a análise por imunofluorescência, realizada no período do 7º dia, foram plaqueadas uma concentração de $2x10^3$ células por disco, sendo utilizados 2 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO). As células foram fixadas durante 10 minutos em temperatura ambiente usando paraformaldeído a 4% em 0,1 M de tampão fosfato de sódio (PB), pH 7,2. Para a coloração e imunomarcação com sialoproteina óssea (BSP) e osteopontina (OPN). Após a lavagem em PB, as culturas foram processadas para imunofluorescência [55, 56]. O processamento, resumidamente, as culturas foram permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em PB durante 10 minutos, seguido de bloqueio com 5% de leite desnatado em PB durante 30 minutos. Anticorpos primários monoclonais contra BSP (anti-BSP 1: 200, WVID1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), e osteopontina (anti-OPN , 1: 800, MPIIIB10-1, Hybridoma Bank, Iowa City, IA) foram utilizados, seguido por Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha) de cabra conjugado com o anticorpo secundário anti-rato (1:

200, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) e Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) conjugado de faloidina (1: 200, Molecular Probes), como um marcador de citoesqueleto. A substituição do anticorpo monoclonal primário com PB foi utilizada como controle. Todos as incubações dos anticorpos foram realizadas num ambiente umidificado durante 60 min à temperatura ambiente. Entre cada passo de incubação, as amostras foram lavadas em PB (3 x 5 min). Antes das observações no microscópio, os espécimes foram lavados em H_2O destilada e os núcleos das células corados com 40,6-diamidino-2-fenil-indole, di-cloridrato (DAPI, Molecular Probes), na proporção 1: 300, durante 5 minutos. Os discos foram colocados com a face para cima em lâminas de vidro e cobertos com lâmínulas de vidro com 12 mm de espessura (Fisher científica, Suwanee, GA).

Os espécimes foram examinados em microscópio de epifluorescência através do microscópio óptico Leica DMLB, com objetivas no plano N (x 2.5/0,07, x10/0,25, x20/0,40) e objetivas Fluotar HCX PL (x40/0,75, x100/1,3). As imagens digitais adquiridas foram processadas com o *software* Adobe Photoshop (versão 7.0.1, a Adobe Systems).

Atividade da Fosfatase Alcalina

Para avaliação da proteína total e atividade da fosfatase alcalina no período do 10ºdia, foram plaqueadas uma concentração de $2x10^4$ células por disco, sendo utilizados 4 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO).

A determinação do conteúdo de proteína total foi realizada por meio da modificação do método de Lowry [57]. As proteínas foram extraídas com 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma) durante 30 minutos e misturados numa proporção de 1: 1 com solução de Lowry (Sigma) durante 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente fenol de Folinand Ciocalteau (Sigma) durante 30 min à temperatura ambiente. A absorbância medida a 680 nm utilizando um espectofotômetro (Cecil CE3021, Cambridge, Reino Unido). O teor total de proteína foi calculado a partir de uma curva padrão e expressa em mg/ml.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi analisada nos mesmos fragmentos utilizados para a determinação do teor total de proteínas como a liberação de timolftaleína a partir da timolftaleína monofosfatase, usando um kit comercial (labtest Diagnóstica, MG, Brasil). Resumidamente, 50 µl de timolftaleína monofosfato sendo misturada com 0,5 mL de 0,3 M de tampão de dietanolamina, com pH 10,1, durante 2 minutos a 37º C.

A solução foi adicionada a 50 µl dos fragmentos obtidos a partir de cada poço durante 10 minutos a 37º C. Para a revelação da cor, foram adicionados 2 ml de 0,09 M de Na_2CO_3 e 0,25M de NaOH. Após 30 min, a absorbância foi medida a 590 nm e a atividade da ALP calculada a partir de uma curva padrão, utilizando timolftaleína para dar uma gama de 0,012-0,4 mmol timolftaleína em h/ml. Os dados foram expressos como a atividade da ALP normalizados para o conteúdo total de proteína [57].

Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos

Para a avaliação da mineralização no período de 21 dias, foram plaqueadas uma concentração de $1,5x10^4$ células por disco, sendo utilizados 5 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO).

No período final, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS aquecido e fixadas com formalina tamponada a 10%, durante 24 h à temperatura de 4ºC. Após o período de 24 horas, foi realizada a retirada da formalina e realizado a desidratação numa série graduada de álcoois e coradas com 2% de vermelho de alizarina (Sigma), em pH 4,2, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Assim, os espécimes foram fotografados por câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel câmera, sensor de 6.3 MegapixelCMOS, em uma Canon EF 100 mm F 2.8 / macro). A extração do vermelho de alizarina foi realizada através da colocação de 150 µl de ácido acético a 10% em cada poço, sob agitação suave por 30 minutos. Em seguida, a camada celular foi raspada e a solução foi transferida para *eppendorf* de 1,5ml e agitado em *vortex* por 30 seguntos. Foi realizado o aquecimento a 85ºC durante 10 minutos para o rompimento dos nódulos, o resfriamento foi realizado em gelo durante 5 minutos e em seguida os tubos foram centrifugados a 20.000g durante 15 minutos. Em uma placa de 96 poços (ELISA), o sobrenadante foi transferido juntamente com a adição de 40 µl de hidróxido de amônia a 10%, sendo por fim realizado a leitura no leitor de placas µQuant (Bio-Tek Instruments Inc.) e os dados foram expressos como absorvância, em um comprimento de onda de 405nm.

Devido a análise através corante de Vermelho de Alizarina para ensaios de mineralização, foram incluídos discos de cada grupo (Controle, AC e PEO) sem células como utilização de controle.

Análise Estatística

Para a realização da análise estatística, todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), com valor de significância de p <0.050, sendo utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA). A análise dos resultados do PCR em tempo real foi realizada através do teste estatístico Kruskal-Wallis um fator. Para avaliação dos resultados obtido através da Viabilidade Celular, foi utilizado o teste ANOVA dois Fatores. Para os resultados obtidos através da Atividade da Fosfatase Alcalina e Nódulos de Mineralização, foi utilizado o teste ANOVA um fator.

3.2.2 Estudo in-vivo

Instalação de implantes

Neste período (90 dias após a ovariectomia (OVX) e cirurgias SHAM e 10 dias após a ambientação das ratas senis no biotério), os animais foram sedados e foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região 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 periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Assim, foram utilizados implantes de Ti-6Al-4V com superfície texturizada por ataque ácido/jateamento conforme disponibilidade da empresa do Setor – Emfils Implantes Odontológicos (ácidos nítrico, detergente neutro, álcool 95%, secagem, jateamento com óxido de alumínio, álcool 99%, ácido nítrico, detergente neutro, água destilada, álcool 95%, secagem e embalagem), de acordo com os parâmetros da empresa do Setor que forneceram os implantes (grupo AC), ou implantes com superfície texturizada com PEO e incorporadas com CA/P. As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2,0 mm e altura de 6,0 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a

fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4 mm 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), com travamento e estabilidade inicial (Figura 7).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Portanto, cada animal recebeu os dois implantes que foram testados neste estudo: com texturização controle (AC) ou teste (PEO com incorporação de Ca/P). A escolha das tíbias para a instalação de implantes do grupo controle ou teste foi realizada de forma aleatória, por meio do website: 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.

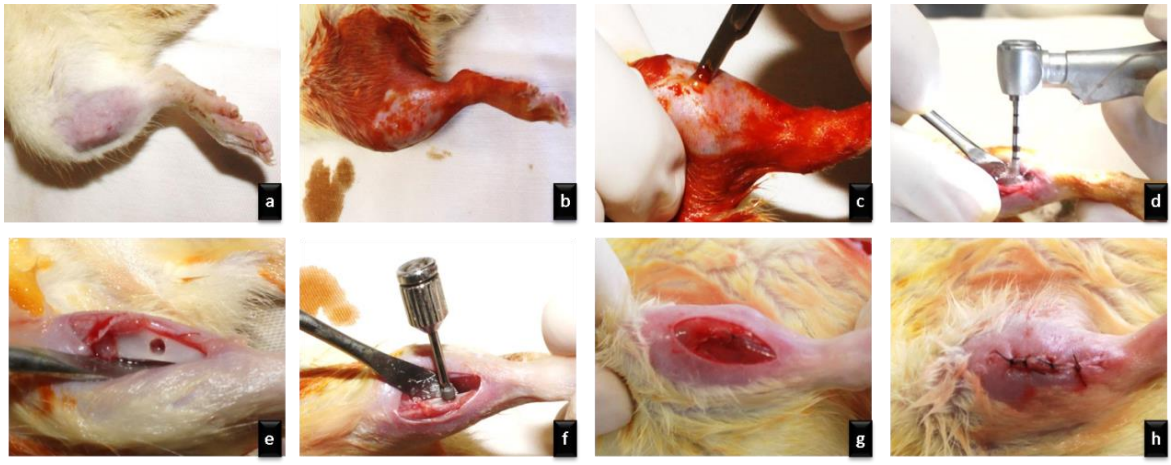


Figura 7*- Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Tricotomia, (B) antissepsia com PVPI; (C) Acesso cirúrgico à metáfise tibial; (D) e (E) Procedimento cirúrgico de preparação da tíbia para instalação dos implantes e leito ósseo receptor do implante; (F) Instalação do implante com a chave digital; (G) Reposição dos tecidos incisados e sutura por planos; (H) Sutura em pele.*

Análises do reparo ósseo periimplantar

Processamento laboratorial para tecidos descalcificados

Análise histológica

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (Tiopental sódico na dosagem de 150 mg/kg associado a lidocaína 2% pela via intraperitoneal) aos 42 dias após a instalação dos implantes, em que foram retiradas as áreas da região da cirurgia experimental para a realização da análise histológica dos cortes em parafina. Logo após à eutanásia, os animais tiveram as tíbias com os implantes instalados fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (10%) por 8 semanas. Neste momento, os implantes foram removidos por movimento anti-horário com chave digital hexagonal 1,2 mm. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois de 70 a 100%. Após estas etapas, a diafanização foi realizada com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 μm de espessura e montados em lâminas histológicas. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e as ímpares para as reações de imunoistoquímica.

Imunoistoquímica

Após a descalcificação dos tecidos periimplantares e confecção das lâminas histológicas que estavam incluídas em parafina, para as reações de imunoistoquímica, 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 policionais, produzidos em cabra, utilizados foram contra fosfatase resistente ao tartarato (TRAP; SC 30832; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteoprotegerina (OPG; SC 21038; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL; SC 7627; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteocalcina (OC; SC 18319; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (OC).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a avidina e biotina (PK 6100; kit elite, Vector

Laboratories) e a diaminobenzidina (Dako, Denmark, SC – U.S.A.) como cromgeno. Após essa estapa, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer. 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 alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representarão: 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 [58, 59].

Processamento laboratorial para tecidos calcificados

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (Tiopental sódico na dosagem de 150 mg/kg associado a lidocaína 2% pela via intraperitoneal) aos 60 dias após a instalação dos implantes.

Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional estrutural do tecido ósseo, os outros 16 animais pertencentes aos grupos SHAM, OVX e SENIL, tiveram as peças (tíbias) removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70%, em que primeiramente foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.05 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No *software Data Viewer* (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o *software CTAnalyser* – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área circular ao redor de todo o implante (ROI) delimitada por 0,25 mm em torno de todo o implante. Esta área ficará definida como Área Total (0,25mm

de margem ao redor dos implantes- ROI 2,38mm x 2,38mm) (Figura 8). O *software CTAn* analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershould). Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do implante (Figura 9), o *threshould* utilizado na análise foi de 45-255 tons de cinza, que possibilitará a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes.

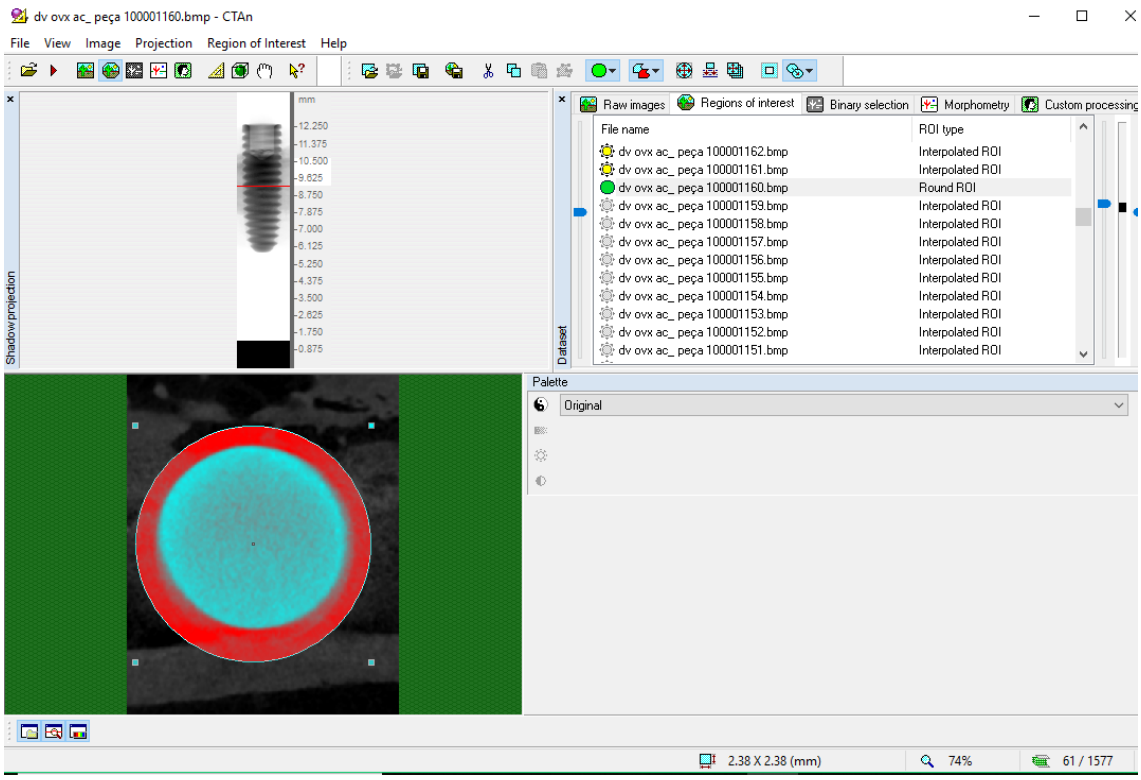


Figura 8 *- Demarcação da ROI no software CTAnalyzer. O quadro vermelho mostra uma aproximação para melhor visualização da área ao redor do implante correspondendo a região óssea mais crítica (medular).*

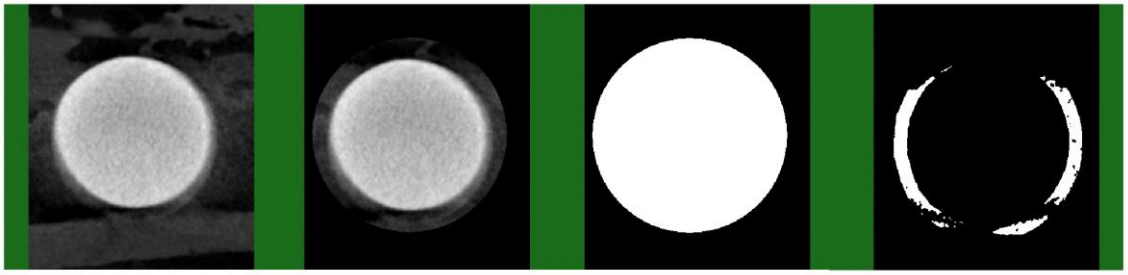


Figura 9 *– Seleção da área de interesse (ROI).*

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

Teste biomecânico dos implantes (contra-torque)

Para a análise biomecânica, após a realização das microtomografias, metade das tíbias foram estabilizadas em morsa de mesa e com uma chave digital hexagonal de 1,2mm adaptado ao hexágono do implante, o torquímetro digital foi acoplado.

Um movimento anti-horário foi aplicado movimento 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).

Microscopia Confocal a laser (dinâmica do osso periimplantar)

Após a realização das microtomografias, a outra metade das peças retornou para o término do processamento laboratorial dos tecidos calcificados, passando 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 forão 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 a utilização apenas da resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e em seguida, realizado o 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 μm de espessura.

A partir da obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópico confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens obtidas a partir de diferentes secções das tíbias na região ao redor dos implantes, foram comprimidas a fim de obter o melhor ajuste. Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitiu obter o melhor ajuste de imagens que representará a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens iniciam desde o início da fluorescência, o que representa na nossa metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens possuem a dimensão de 1x1 mm² e correspondentes a secções óticas de 512 por 512 *pixels*. Secções de 2µm foram escaneadas por 2,5min. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação do "*double dochroic*" 488/568 nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representam os filtros que permitiram visualizar os fluorocromos. Eles são localizados no microscópio e quando a luz da lâmpada de mercúrio passa por essas barreiras e alcança os cortes dos espécimes, é possível visualizar as cores dos fluorocromos. Um dos filtros possibilitam a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstituídas através de *software* para a manipulação do microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. O período de aplicação dos fluorocromos foram aos 14 dias, sendo aplicado a calceína (verde) representando o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina, no periodo de 42 dias, marcando em fluorocromos vermelhos, representando o osso novo. A dinâmica do tecido ósseo é representada pelo *turnover* ósseo, que é observado através da renovação óssea representada pelos fluorocromos vermelhos. Quanto maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo, enquanto que a fluorescência verde representa o osso velho. Essa dinâmica permite observar as duas situações no mesmo corte, portando, observar o que é novo do que é velho.

O osso da tíbia (região periimplantar) apresentam duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa uma precipitação de

cálcio de acordo com cada um dos períodos (14 e 42 dias), assim mostrando a conversão de osso velho para osso novo (Figura 10). Essas imagens foram salvas no formato TIFF a e analisadas no *software ImageJ* (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), usando a ferramenta "*color threshold*", cada imagem foi padronizada de acordo com a tonalidade, saturação e brilho. Primeiro, a calceína foi destacada, e a ferramenta "*mensure*" foi utilizada para prover a área em μm². O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. O *turnover* ósseo, nessa abordagem metodológica, foi representado pela diferença entre osso velho (verde) e osso novo (vermelho). Além disso, foi calculado a taxa de aposição mineral (*Mineral apposition rate* - MAR) a partir das imagens sobrepostas (vermelho/verde), por meio da ferramenta "*straight*" também do *software Image J*, mensurando a distância em μm entre o início da precipitação da calceína até o outro extremo da precipitação do vermelho de alizarina.

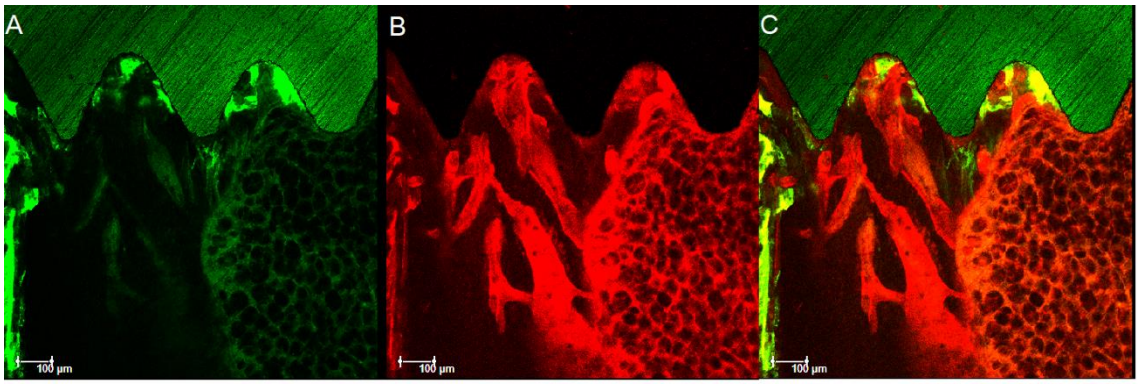


***Figura 10** - Imagens fluorescentes obtidas por microscopia confocal a laser mostrando a precipitação de calceína - cor verde (A), vermelho de alizarina - cor vermelha (B) e a sobreposição de ambos os fluorocromos - caldeina/alizarina (C), para a quantificação dos fluorocromos aos 14 e 42 dias após a instalação dos implantes.*

Histometria

As mesmas peças que foram montadas nas lâminas histológicas dos tecidos calcificados dos grupos pertencentes ao estudo de reparo ósseo ao redor dos implantes em tíbias, após a análise em microscopia confocal foram lavadas em água deionizada e 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 será considerada como valor representativo da unidade. Assim, após a fotomicrografia das lâminas histológicas e salvas em arquivo TIFF, essas foram analisadas no *software Image J* (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), que por meio da ferramenta "*straight*", calculando o perímetro de osso formado na interface osso/implante (ELCOI) em *pixels*². 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 *pixels* (Figura 11) [60].

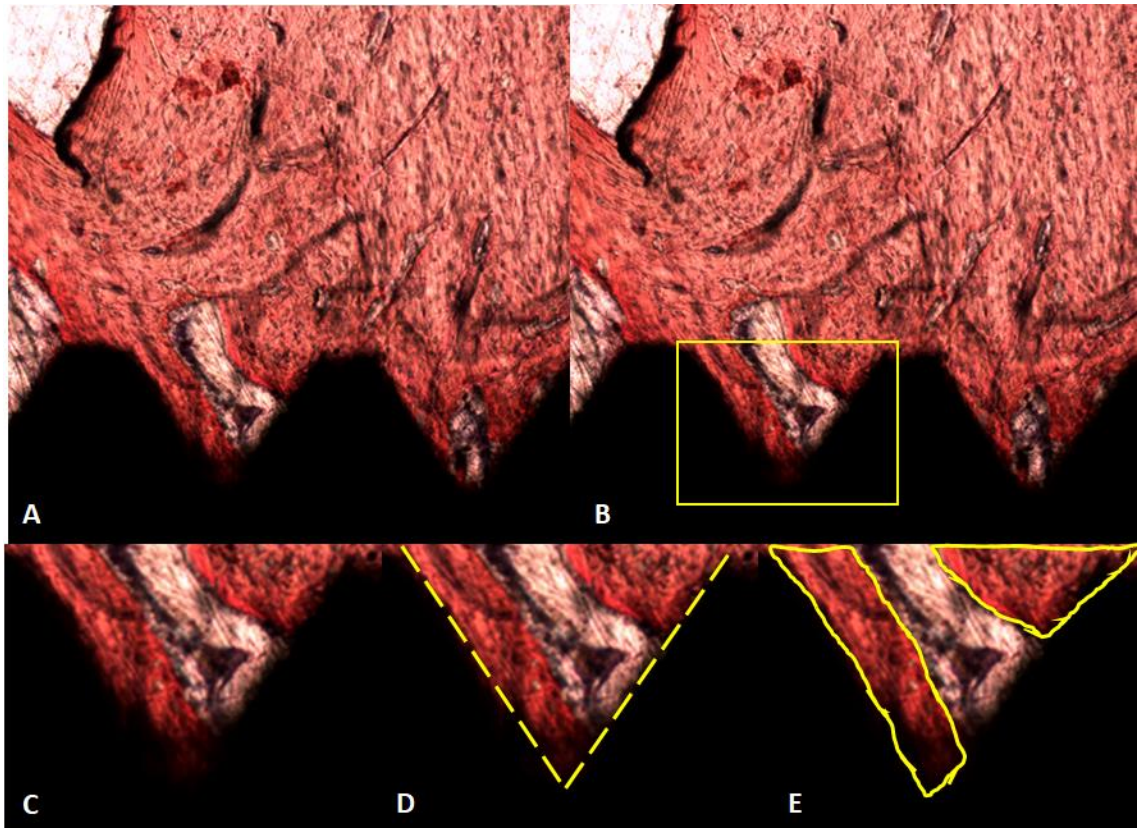


Figura 11 *– Imagem representativa de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para análises histométricas: ELCOI e AON. (A) figura que representa o corte de tecidos calcificados da área de interesse a ser utilizado. (B e C) região periimplantar – área de interesse para análise (área negativa: implante; e osso em contato com o implante) mais central. (D) região de interesse (triângulo formado na interface do osso com o implante, da região correspondente a espira mais central, selecionada através do programa Image J e através da ferramenta de desenho livre "free hands". (E) mensuração da área de osso neoformado, regiões coradas pelo vermelho de alizarina.*

Análise Estatística

Para a realização da análise estatística nos parâmetros proteicos da imunoistoquímica (OPG, RANKL, OC e TRAP), foi aplicado teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn para as comparações que mostraram diferenças significantes.

Para os dados obtidos pela microtomografia, BV.TV., Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po.(tot), foi realizado a análise estatística pelo T- test, sendo realizado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e Equal Variance Test. E para a análise do torque-reverso foi utilizado o teste Mann-Whitney.

A análise do dinamismo ósseo periimplantar pela marcação de Calceína e Alizarina, foram utilizados os testes ANOVA um fator, Kurskal-Wallis um fator, e não comparação dos fluorocromos (Calceína e alizarina) foi utilizado o teste ANOVA dois fatores.

Os resultados obtidos pela histometria (ELCOI e AON), foram analisados pelos testes ANOVA um fator, Shapiro-Wilk e Equal Variance Test.

Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), com valor de significância de $p < 0.050$, sendo utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in vitro*

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Independente da magnitude do aumento avaliado na MEV (300 ou 2000x), a representação das fotomicrografias mostrou para o grupo teste (PEO), a obtenção de superfície porosa, como poros visualmente homogêneos, com a geometria semelhante a "vulcão" (Figuras 12 e 13).

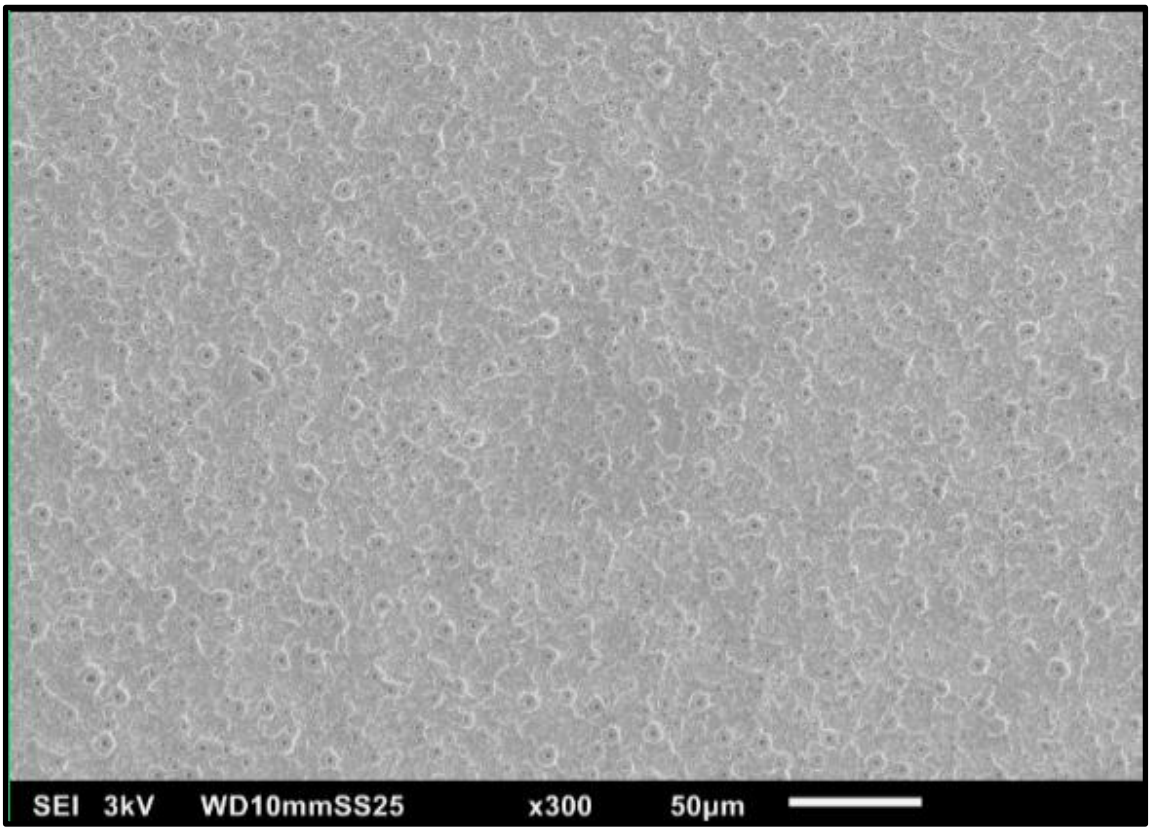


Figura 12 *- Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 300x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.*

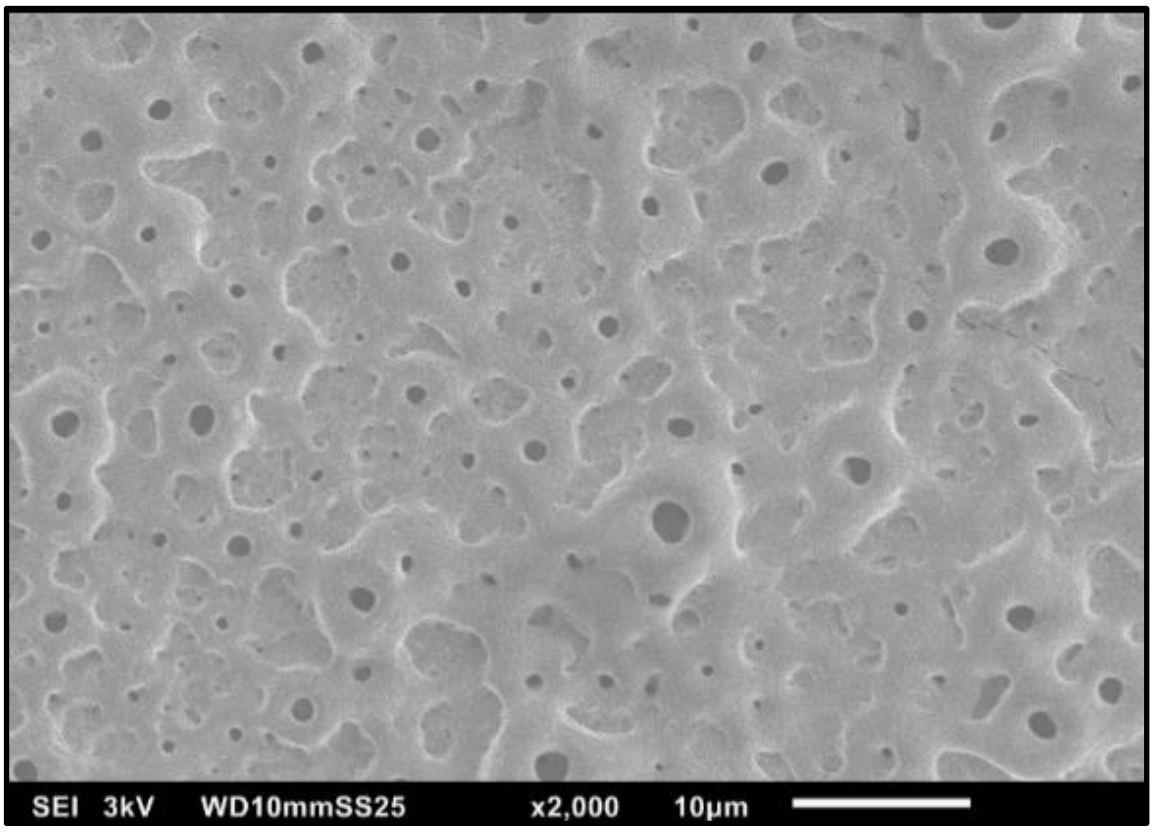


Figura 13 - *Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 2.000x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.*

O mapeamento da composição química elementar desta superfície (PEO) pela técnica de EDS confirmou as proporções de Ti, Al e V na composição dos espécimes, inclusive com a incorporação de Ca e P, como ilustrado nas figuras 14 e 15, por meio das porcentagens de massas dos constituintes da liga.

Chemical formula	mass%	Atom%	Sigma	Net	K ratio	Line
C*	1.72	3.97	0.01	3970	0.0003888	K
O	32.40	56.08	0.09	84176	0.0242463	K
Al*	1.18	1.21	0.08	1961	0.0005727	K
P	9.88	8.83	0.24	4706	0.0016382	K
Ca	nd	nd				
Ti*	3.38	1.95	0.76	1182	0.0018734	L
V*	51.45	27.97	0.99	24845	0.0299016	L
Total	100.00	100.00				

Figura 14*- Quadro de dados representativos da Espectroscopia de Energia Dispersiva da superfície da liga Ti-6Al-4V texturizada por PEO.*

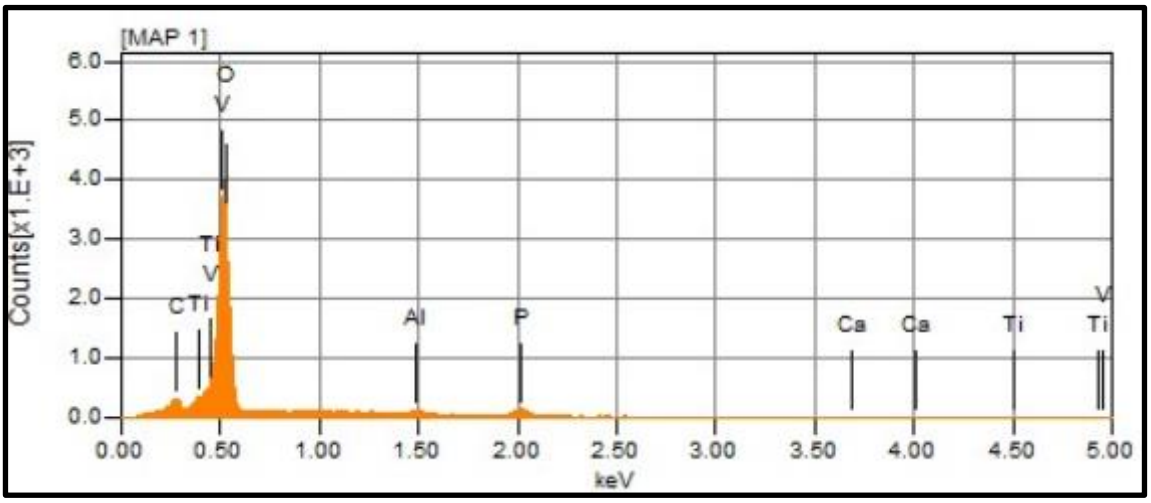


Figura 15 *- Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO pela técnica de EDS.*

O mapa de cores da distribuição dos metais nos espécimes mostrou distribuição homogênea dos constituintes dos espécimes, uma vez que não foi observada qualquer concentração dos metais ou íons em toda a área analisada dos espécimes (Figuras 16 e 17).

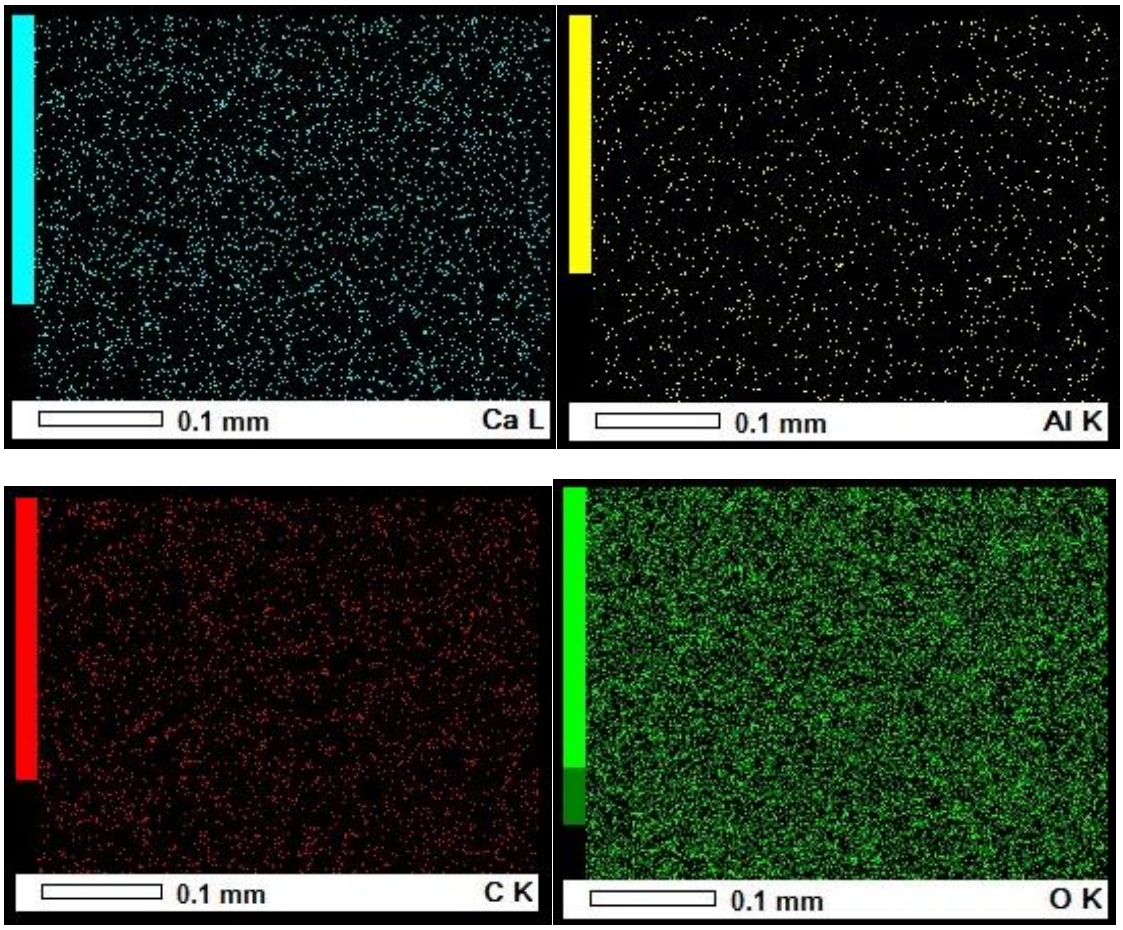


Figura 16 *-Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.*

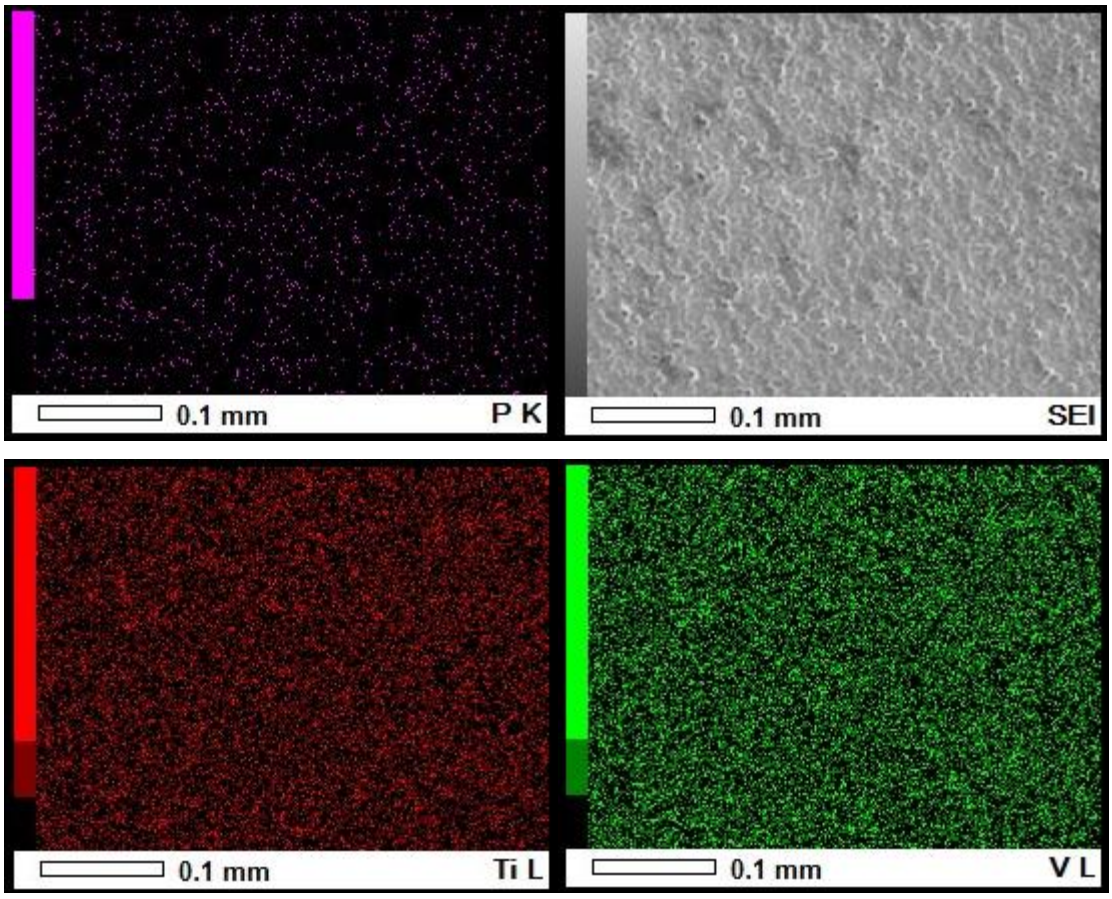


Figura 17 *- Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.*

Nas figuras 18, 19 e 20 é possível avaliar por meio da MEV/EDS, a topografia de superfície dos discos e implantes usinados (USINADOS), AC e PEO, em diferentes magnificações, tanto no período baseline bem como após a remoção dos implantes (no estudo *in vivo*).

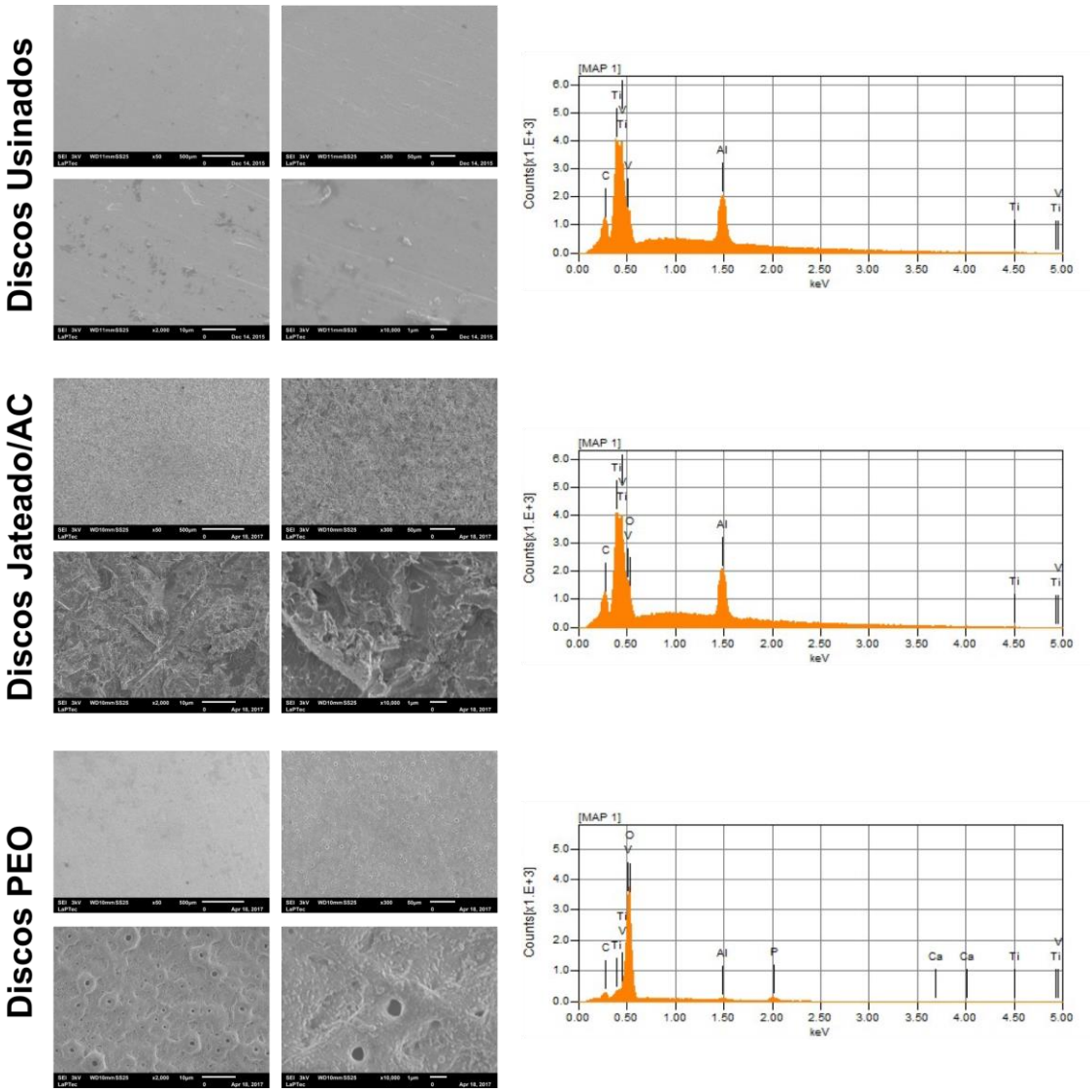


Figura 18 *- Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos discos da liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO.*

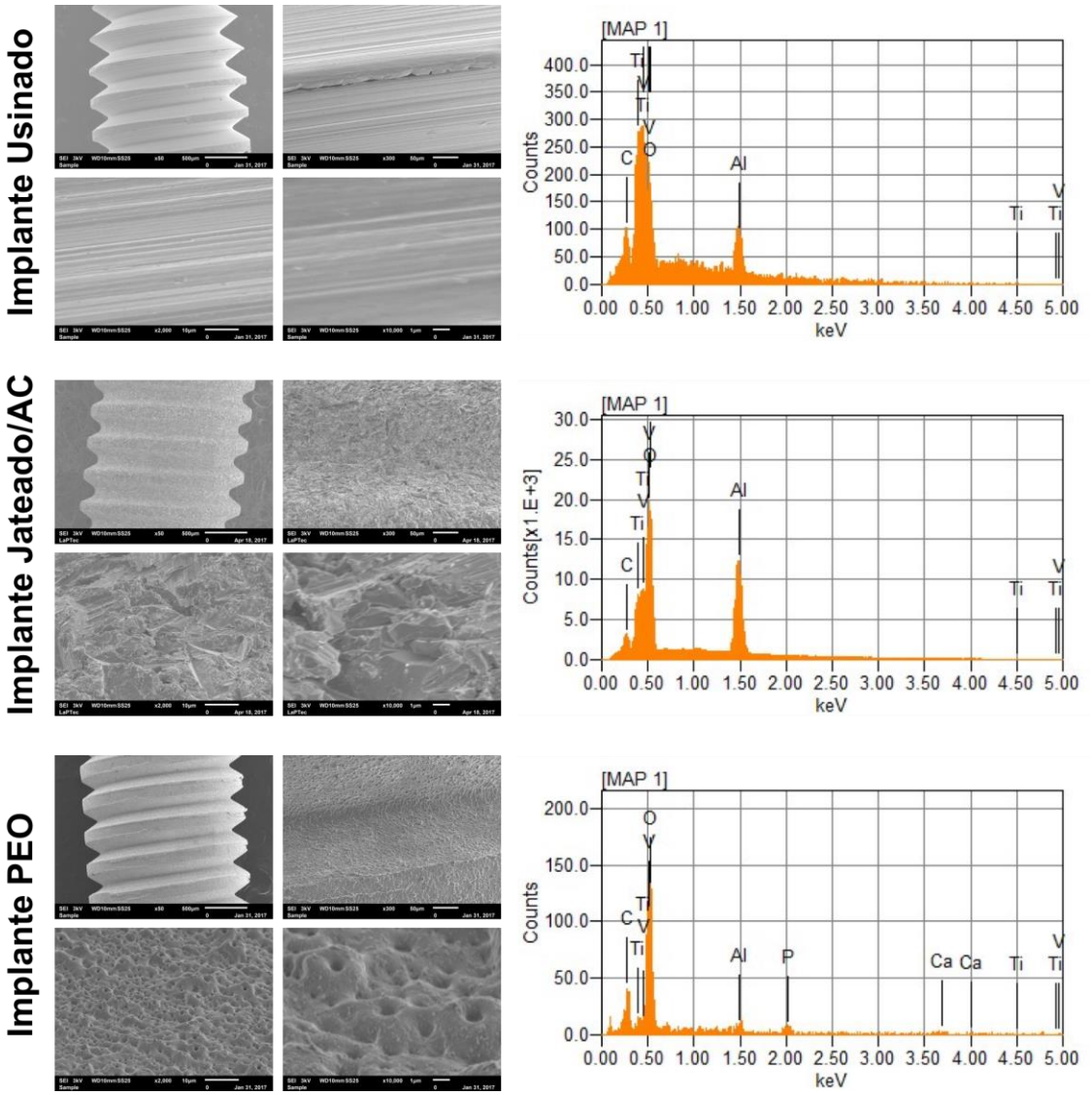


Figura 19 *- Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos implantes de liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO, no período baseline.*

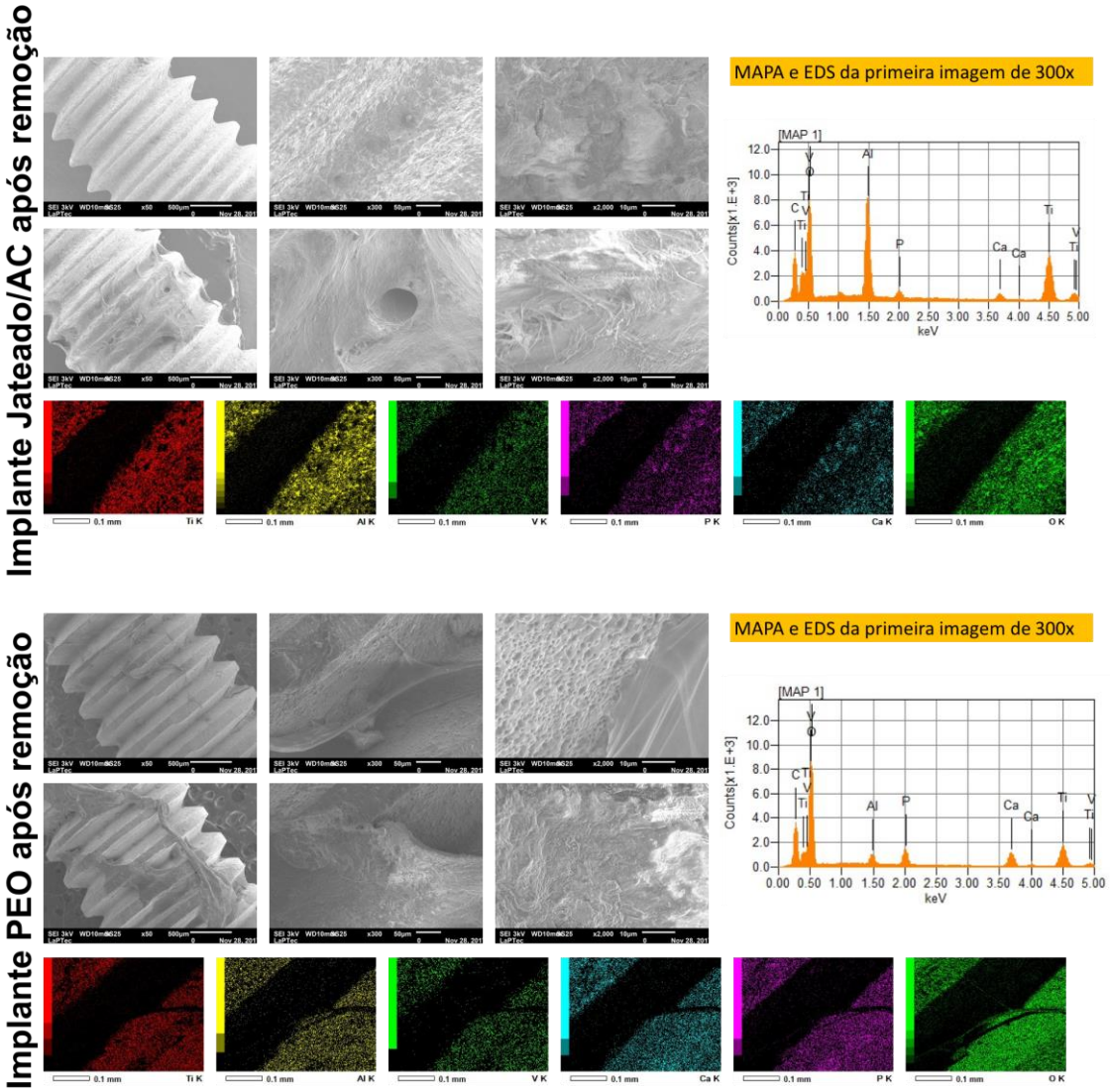


Figura 20 *- Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, e 2.000x e mapa de cores dos implantes de liga Ti-6Al-4V com as superfícies texturizadas por AC e PEO, no período de caracterização das superfícies (antes da remoção) e após o torque reverso (biomecânica: remoção dos implantes)*

Energia livre de superfície e ângulo de contato

A energia livre de superfície dos espécimes analisados evidenciou variação dos resultados de 55,12 ± 0,01 a 61.17 ± 0,01. Estes valores sugerem que o processo de texturização empregado (PEO) promove hidrofilicidade na superfície das amostras. Independente do período analisado nas amostras PEO (antes ou após a esterilização em raios gama), mesmo apresentando após a esterilização, diminuição da energia de superfície e aumento do ângulo de contato, sempre as amostras do grupo PEO apresentaram resultados melhores com comparação ao jateamento e ataque ácido (AC),

um método comercialmente disponível, aqui considerado como grupo controle (positivo). Estes dados podem ser observados e comparados nas Figuras 21 a 22.

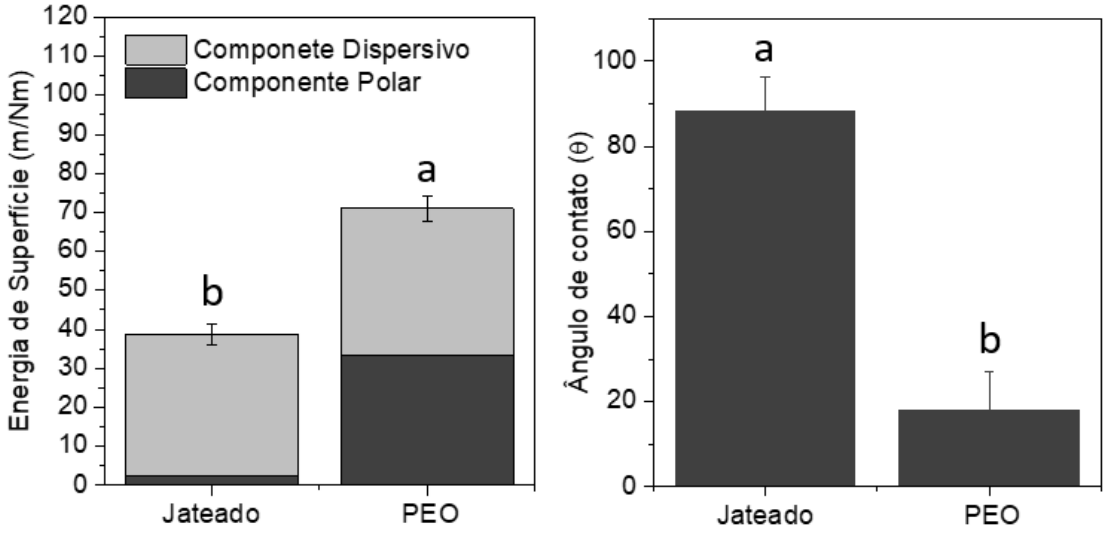


Figura 21 *- Energia de superfície e ângulo de contato com a água feito logo após o tratamento com PEO.*

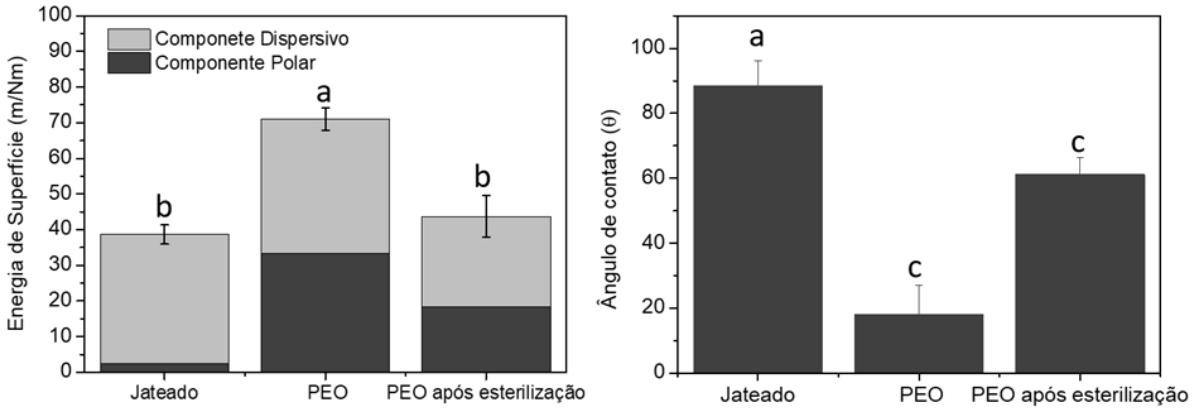


Figura 22 *- Energia de superfície e ângulo de contato - Amostras Jateadas/ácido (AC), PEO e PEO após esterilização.*

Perfilometria (Rugosidade de superfície)

Os dados médios representativos dos valores de Ra, Rq, Rt e Rz podem ser visualizados na figura 18. Independente do parâmetro de rugosidade analisado, não houve diferenças entre os dois métodos de texturização analisados (PEO e AC) ($p>0,05$, teste ANOVA). A rugosidade média (Ra), padrão de comparação nos estudos de caracterização topográfica superficial, apresentou valores médios para as amostras ácido/jateadas na ordem de $0,38 \pm 0,03$ um^2 e para o grupo PEO, $0,39 \pm 0,05$ um^2 (Figura 23).

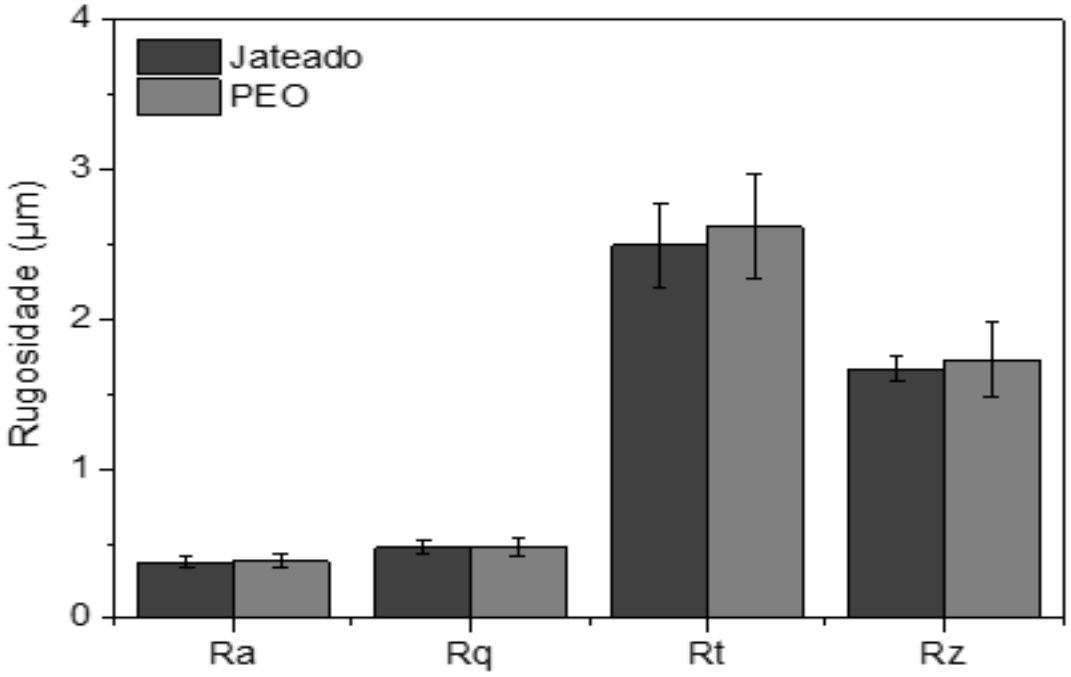


Figura 23 – Valores médios e desvio padrão representativos da rugosidade de superfície para os discos ácido/jateados (AC) e PEO: Ra (p = 0,701) / Rq (p = 0,929) / Rt (p = 0,555) / Rz (p = 0,614).

4.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno

A dosagem de estrógeno, após os procedimentos de ovariectomia (OVX), da cirurgia fictícia (SHAM) ou para a senilidade das ratas mostrou para o grupo SHAM os maiores valores, seguida do grupo SENIL e o menor valor para OVX (p= 0,0003) (Figura 24).

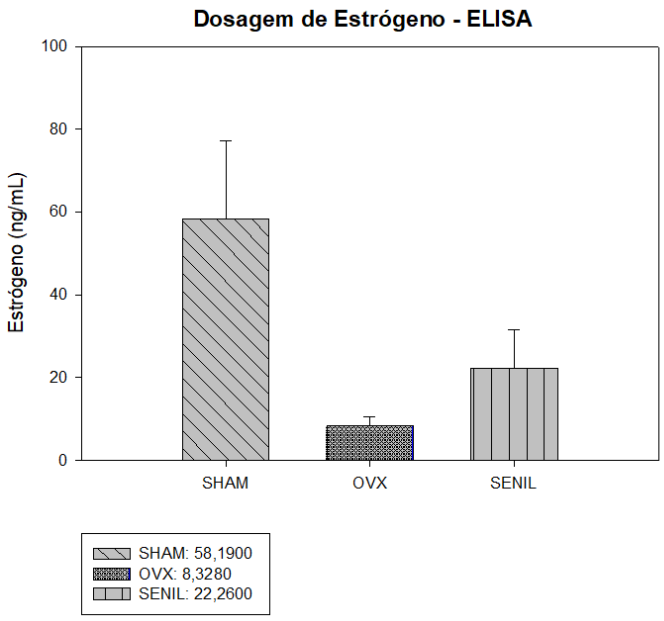


Figura 24 *- Imagem gráfica da dosagem média de estógeno pelo método ELISA para os grupos SHAM, OVX e SENIL.*

4.3 Estudo ex-*in vivo*

Crescimento e Viabilidade Celular

Os valores representativos atribuídos na análise de crescimento e viabilidade celular, foram separados por grupos dos animais (SHAM, OVX e SENIL).

Na comparação entre os grupos testes de superfícies no grupo SHAM, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC e PEO x CONTROLE, ambos apresentaram $p<0.001$, e na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística (p 0.673).

O fator de comparação TEMPO (3,7 e 10 dias) intergrupo CONTROLE não apresentou significância estatística. No grupo AC, houve apenas significância estatística (p 0.003) na comparação entre 3 e 10 dias. O grupo PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias (p 0.001) e 7 x 10 dias (p 0.001) (Figura 25).

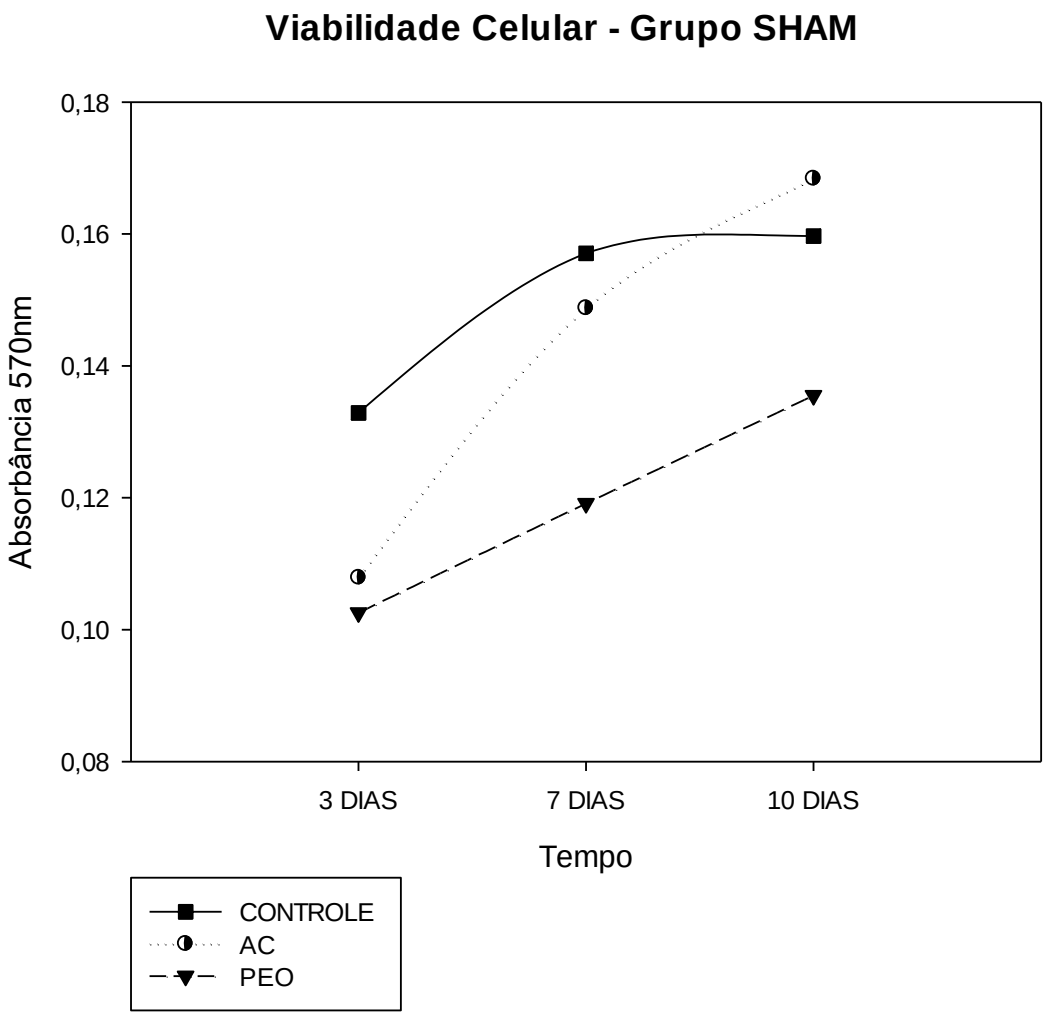


Figura 25 *– Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,132±0,028; Superfície AC 0,107±0,016; Superfície PEO 0,102±0,012. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,157±0,022; Superfície AC 0,148±0,012; Superfície PEO 0,119±0,009. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,159±0,010; Superfície AC 0,168±0,001; Superfície PEO 0,135±0,017.*

No grupo OVX, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC (p 0.001) e PEO x CONTROLE (p 0.002), na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística (p 0.970).

O fator de comparação TEMPO intergrupo CONTROLE, apresentou significância estatística na comparação 3 x 10 dias (p 0.001) e 7 x 10 dias (p 0.001). No grupo AC, houve apenas significância estatística (p 0.028) na comparação entre 3 e 10 dias. O grupo

PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias (p 0.014) e 7 x 10 dias (p 0.010) (Figura 26).

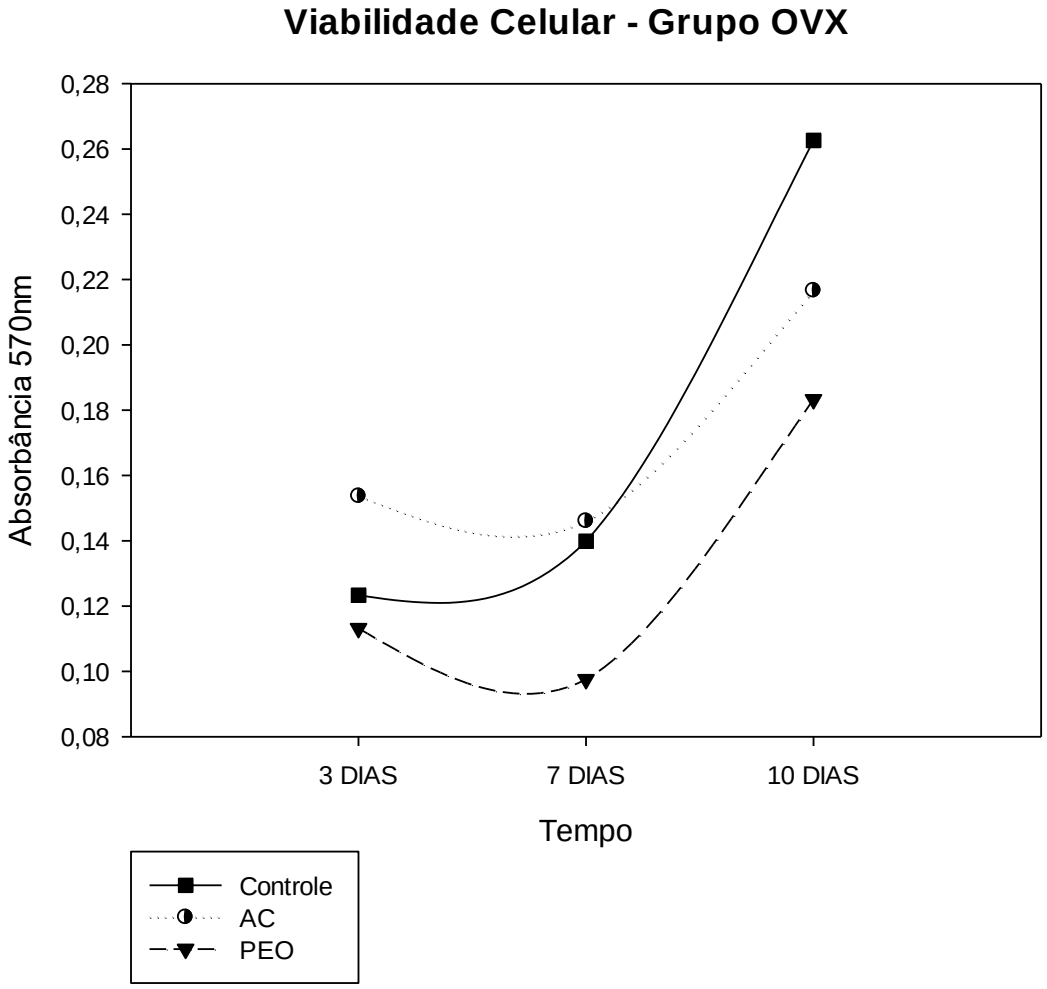


Figura 26 *– Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,132+0,028; Superfície AC 0,107+0,016; Superfície PEO 0,102+0,012. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,157+0,022; Superfície AC 0,148+0,012; Superfície PEO 0,119+0,009. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,159+0,010; Superfície AC 0,168+0,001; Superfície PEO 0,135+0,017.*

No grupo SENIL, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC (p 0.001) e PEO x CONTROLE (p 0.001), na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística (p 0.473).

O fator de comparação TEMPO intergrupo CONTROLE, apresentou significância estatística na comparação 7 x 10 dias (p 0.006). No grupo AC, houve significância estatística em todas as comparações de tempo. O grupo PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias (p <0.001) e 7 x 10 dias (p 0.004) (Figura 27).

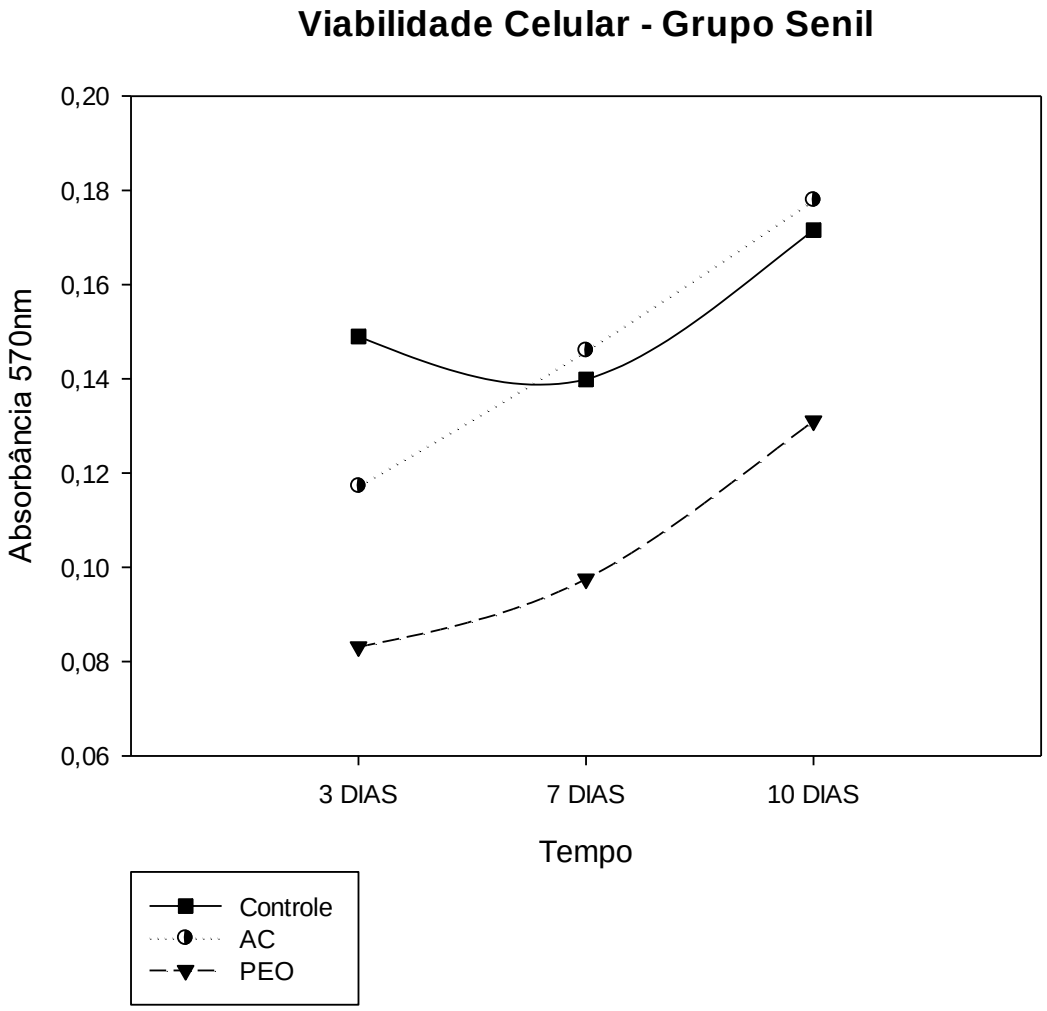


Figura 27 *– Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SENIL. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,149±0,018; Superfície AC 0,117±0,008; Superfície PEO 0,083±0,005. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,139±0,006; Superfície AC 0,146±0,008; Superfície PEO 0,097±0,013. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,171±0,004; Superfície AC 0,177±0,017; Superfície PEO 0,131±0,010.*

Análise por PCR em tempo real

Como resultado da expressão gênica dos 6 genes analisados nas CTMs-MO no grupo SHAM (Figura 28), os discos com tratamento de superfície PEO apresentou maior expressão da Runx2 (p 0,102) e OPN (p 0,156). A superfície AC apresentou expressão maior nos genes SP7 (p 0,156), ALP (p 0,102), BSP (p 0,102) e OC (p 0,102).

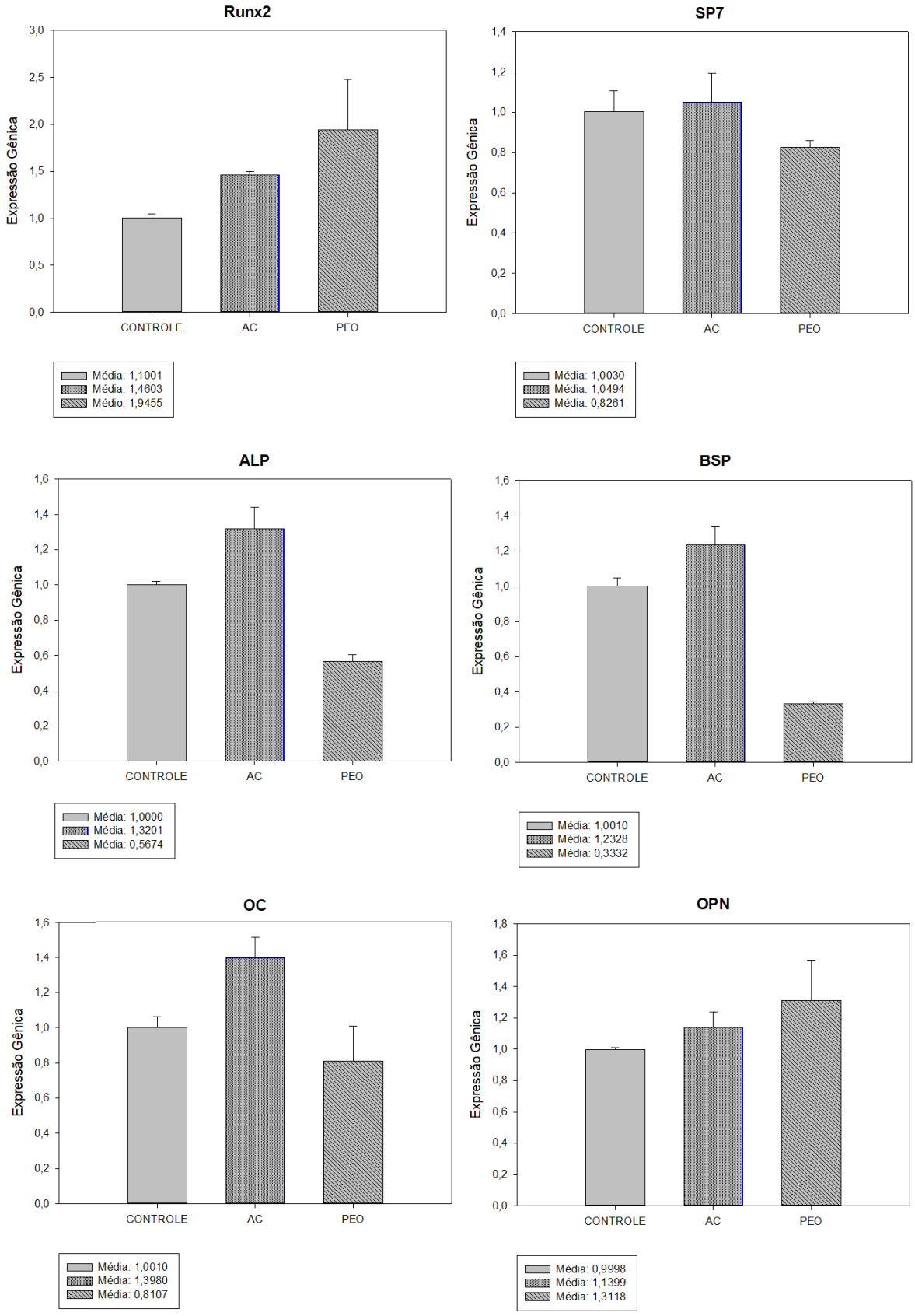


Figura 28 *– Expressão gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SHAM.*

As CTMs-MO do grupo OVX (Figura 29) apresentou nos discos com o tratamento de superfície AC maior expressão dos genes Runx2 (p 0,102), ALP (p 0,102), BSP (p 0,102), OC (p 0,102) e OPN (p 0,102). O gene SP7 (p 0,102) apresentou maior expressão na superfície PEO.

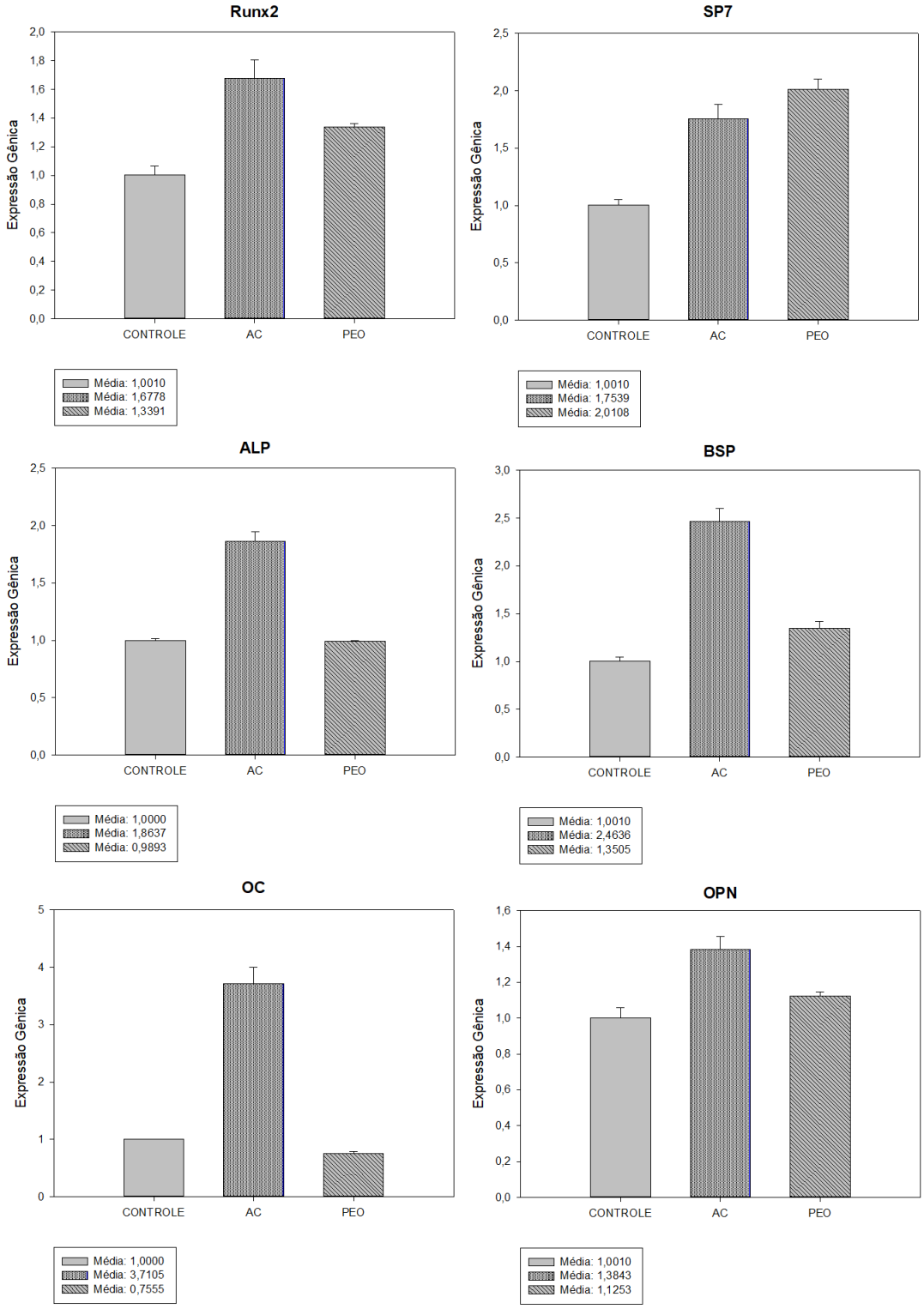


Figura 29 *– Imagem gráfica –Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo OVX.*

O grupo SENIL (Figura 30), apresentou maior expressão gênica da Runx2 (p 0,102), ALP (p 0,102) e OC (p 0,089) no grupo de discos CONTROLE. O grupo de superfície de discos AC apresentou maior expressão nos genes SP7 (p 0,102), BSP (p 0,102) e OPN (p 0,102).

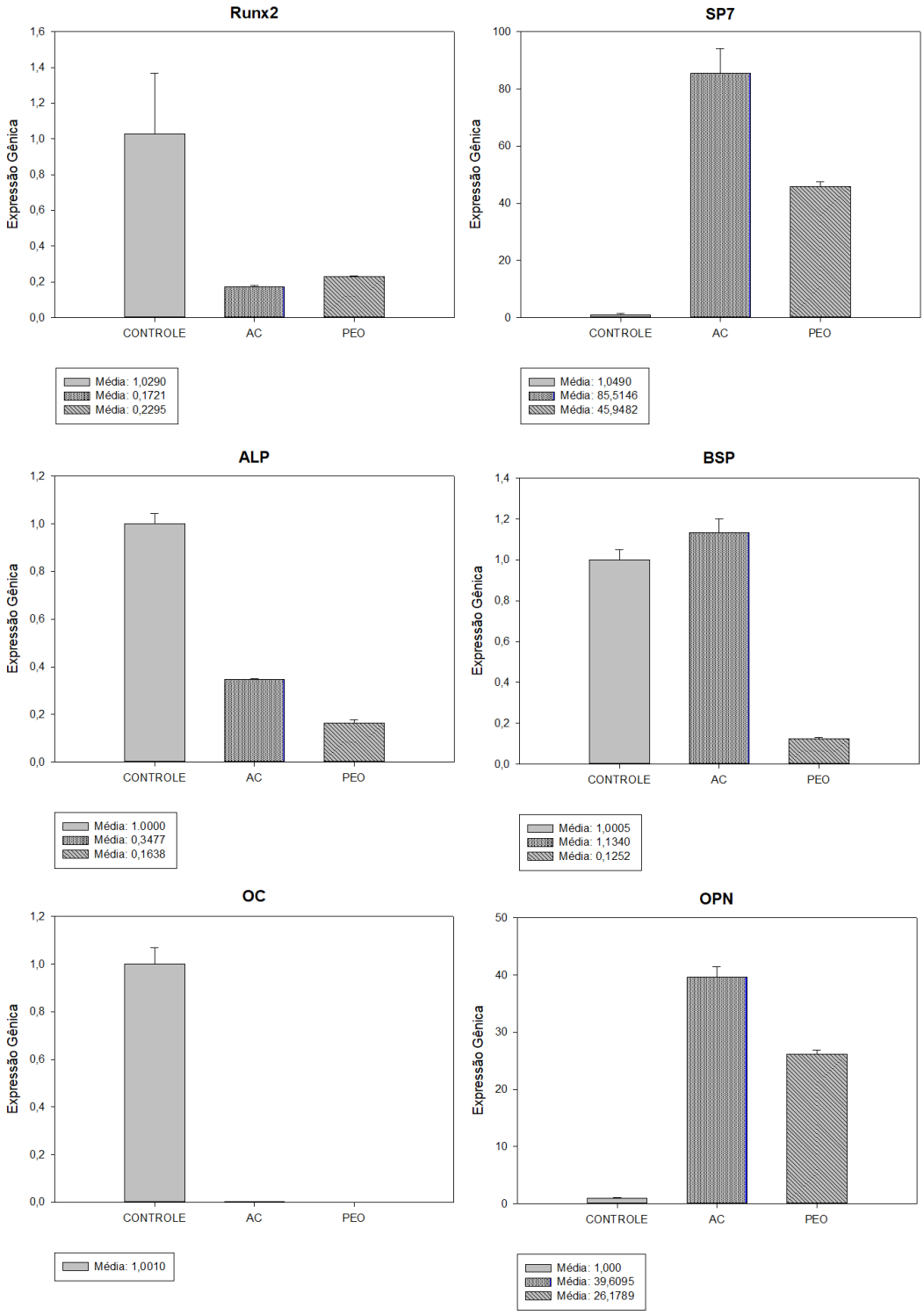


Figura 30 *– Imagem gráfica –Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SENIL.*

Análise por Imunofluorescência

As proteínas osteopontina (OPN) e sialoproteina óssea (BSP) foram expressas através da coloração vermelha, com presença de marcação nas regiões do núcleo celular (coloração azul) e no citoesqueleto celular (coloração verde) (Figuras 31 a 33).

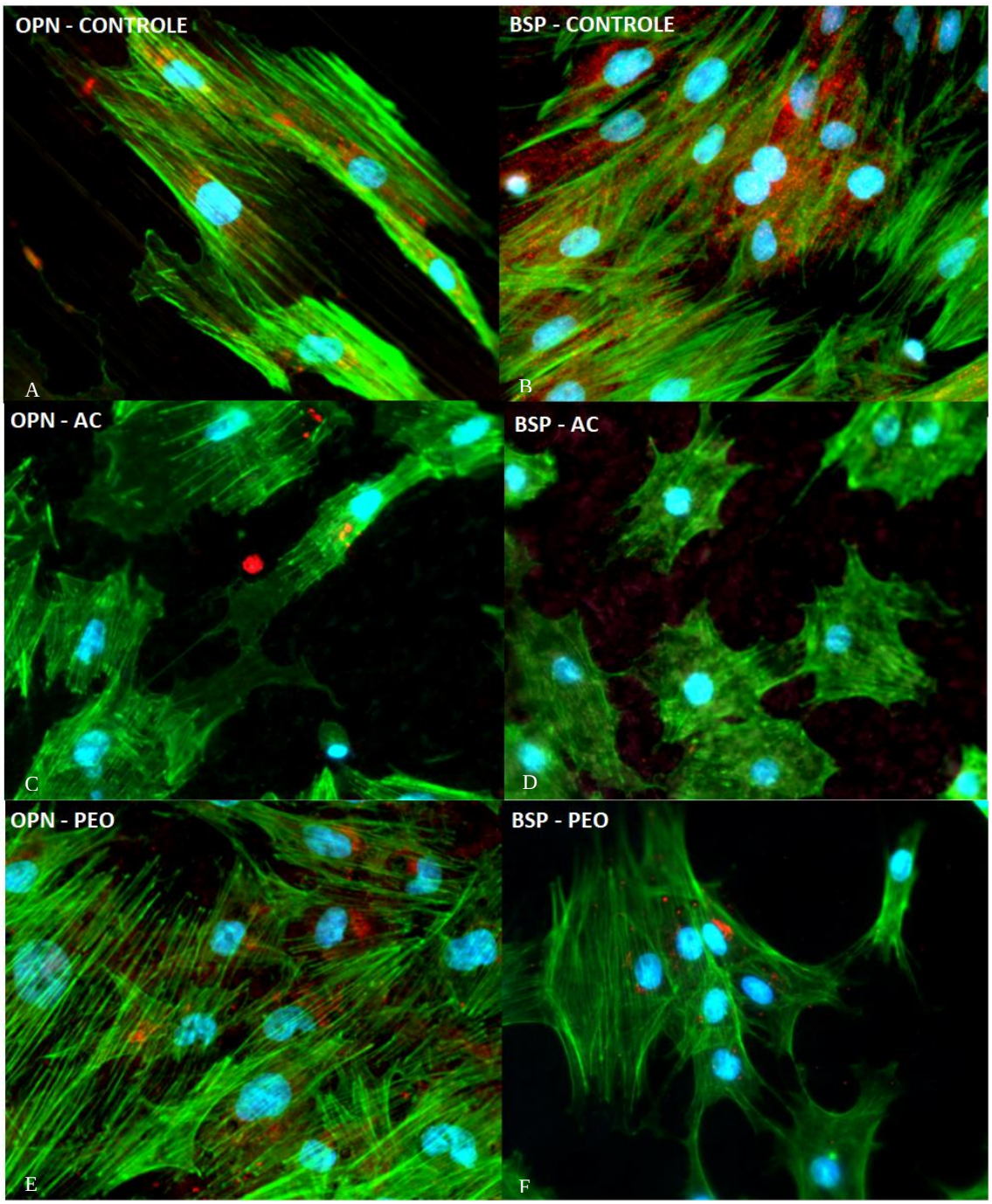


Figura 31 – Grupo SHAM*: Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A, C e D); Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular (B), nenhuma expressão da BSP (D) e pouca expressão no núcleo (F).*

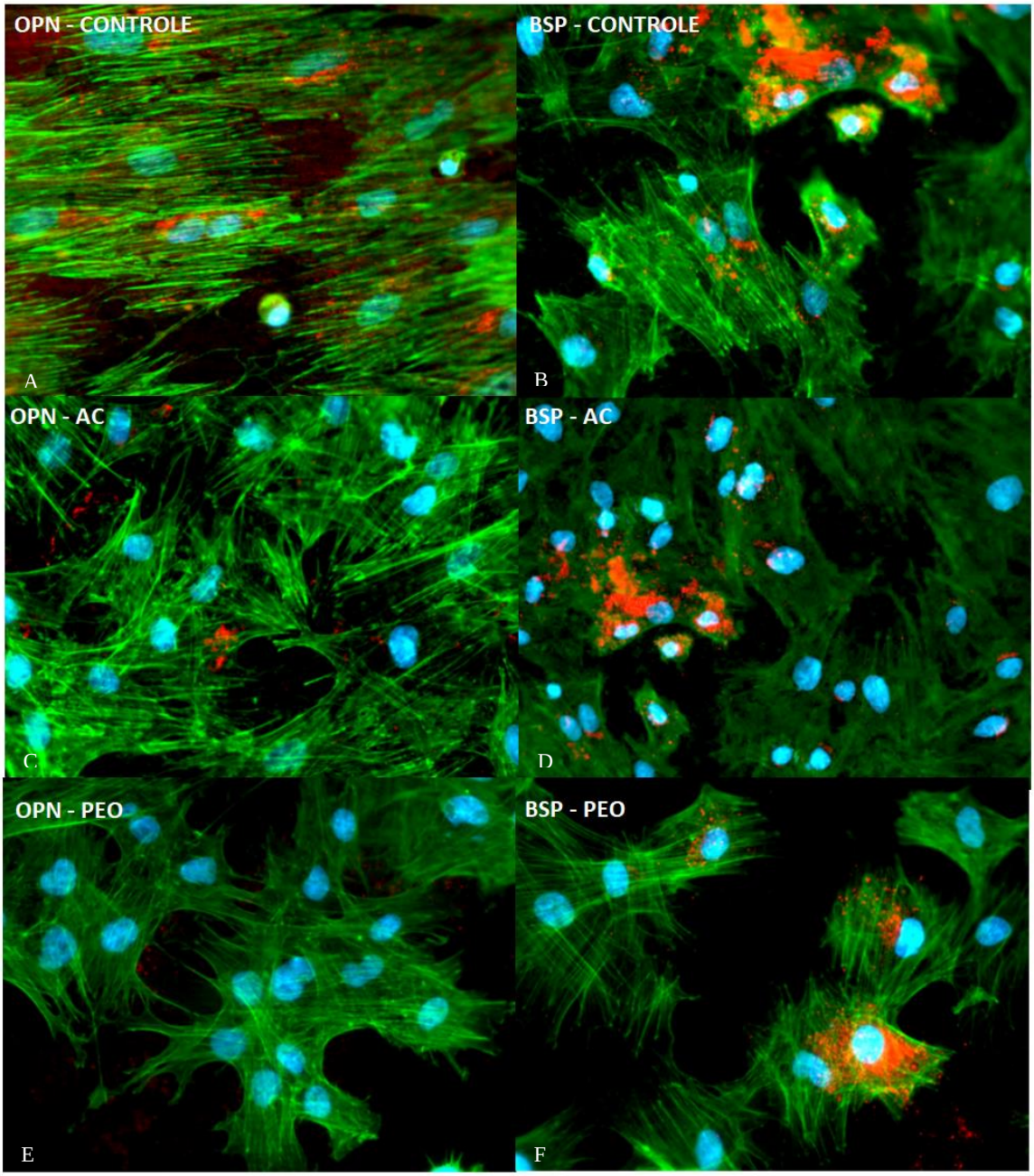


Figura 32 - Grupo OVX: *Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A); Pouca expressão de OPN (C) e nenhuma expressão detectada (E); Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular e no núcleo (B,D e F).*

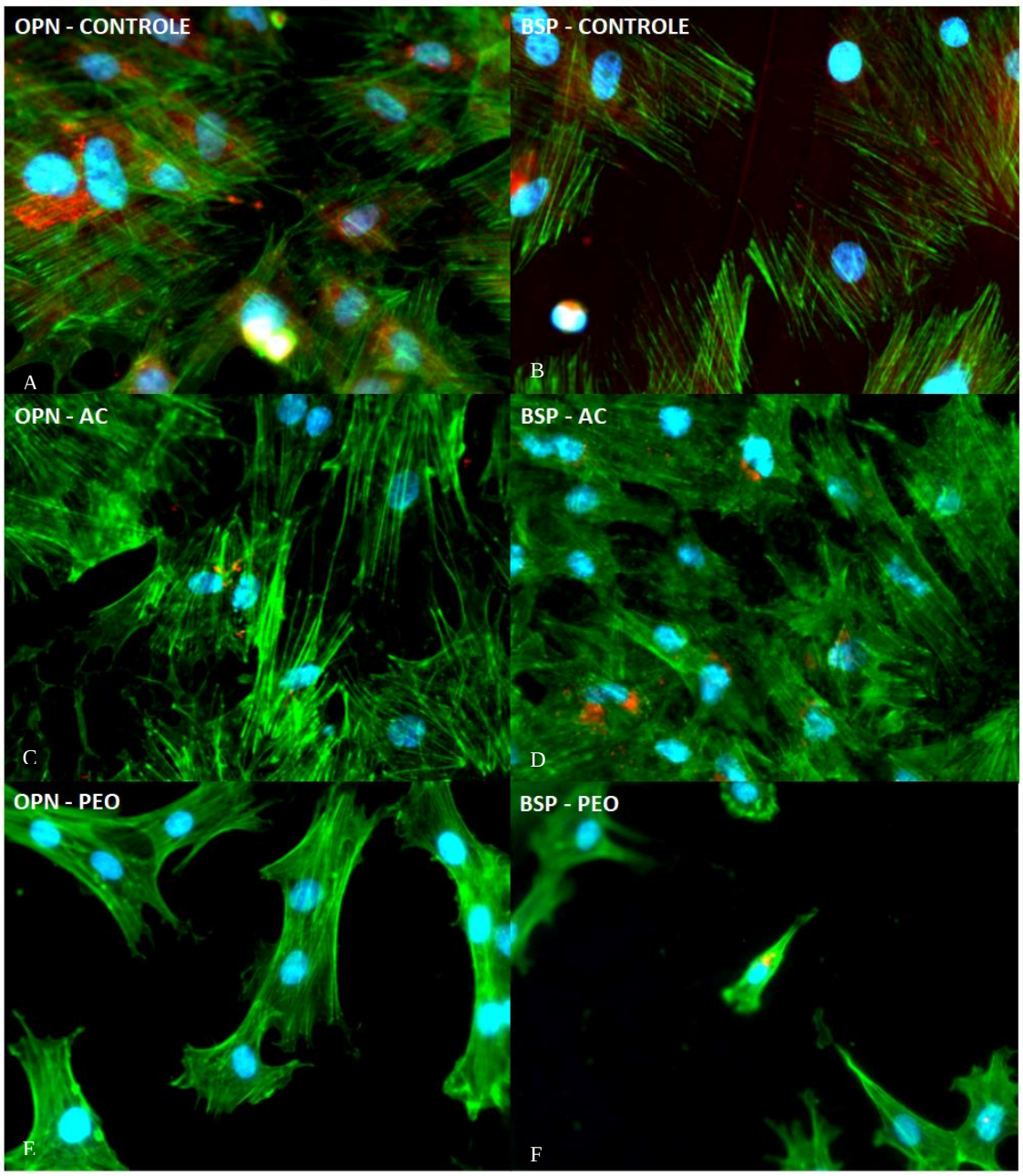


***Figura 33 - Grupo SENIL**: Expressão das proteínas OPN e BSP no citoesqueleto e núcleo celular (A e B); pouca expressão das proteínas OPN e BSP (C e D); nenhuma expressão das proteínas (E e F).*

Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina apresentou um perfil diferente entre as culturas, ocorrendo em maior expressão na superfície PEO no grupo SHAM e uma maior expressão na superfície controle no grupo OVX.

A avaliação da ALP no grupo de células SHAM, apresentou diferença estatística na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.002$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.014$). Não apresentando diferença na comparação entre os grupos Controle x AC ($p > 0.079$).

O grupo de células OVX, houve diferença na comparação entre os grupos Controle x AC ($p <0.004$) e Controle x PEO ($p< 0.003$), não apresentando diferença estatística na comparação das superfícies PEO x AC ($p>0,884$).

Para o grupo de células SENIL, as comparações entre os grupos não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0.082$) (Figura 34).

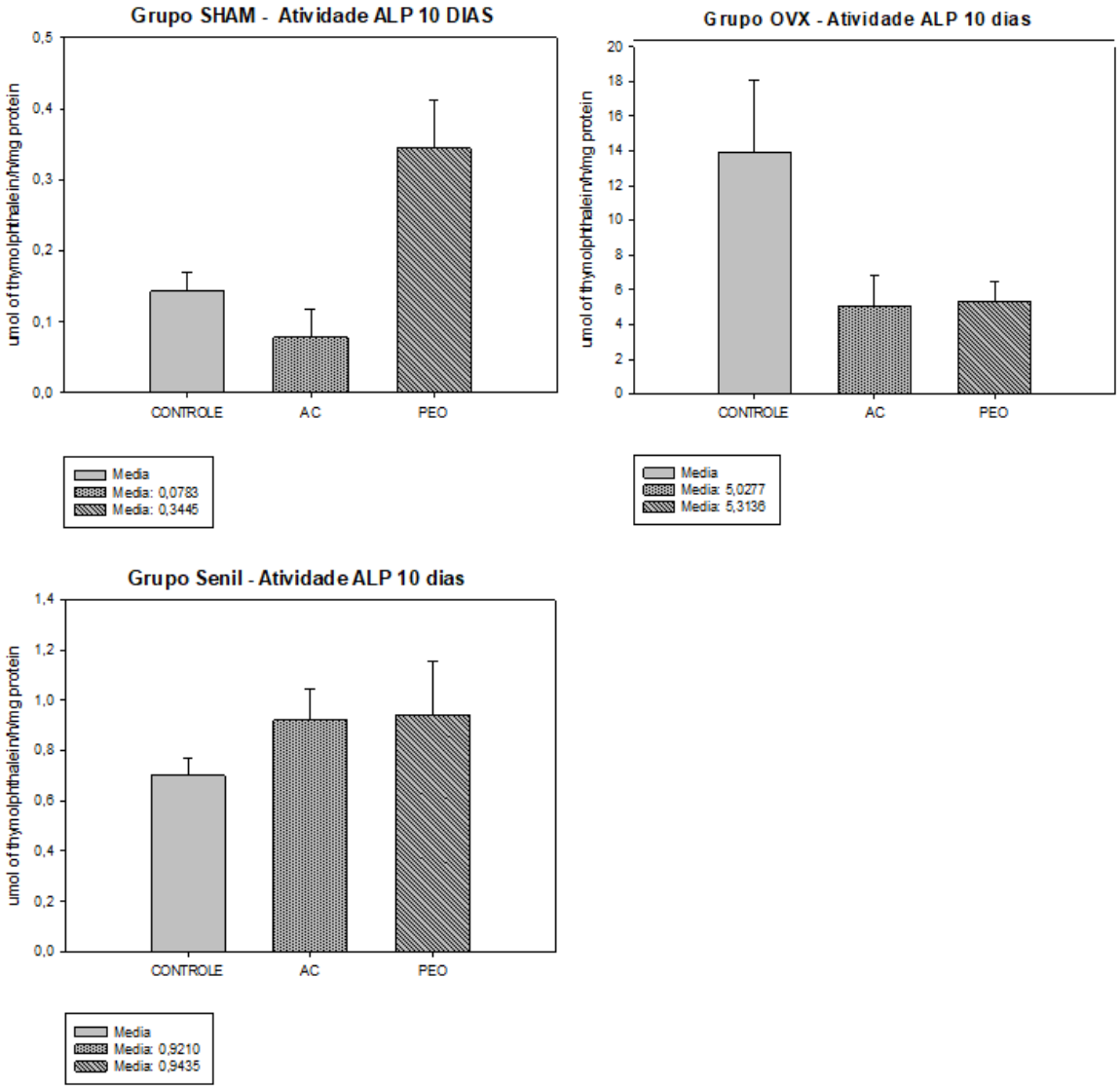


Figura 34 *– Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) no período de 10 dias para os grupos SHAM, OVX e SENIL.*

Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos

A superfície PEO apresentou uma formação de osso mineralizado maior em todos os grupos de cultura celular (SHAM, OVX e PEO).

Para a avaliação da mineralização no grupo de células SHAM, a análise apresentou significância na comparação dos grupos PEO e AC ($p < 0.05$) e nas demais comparações entre grupos, não houve diferença estatística significante (Figura 35).

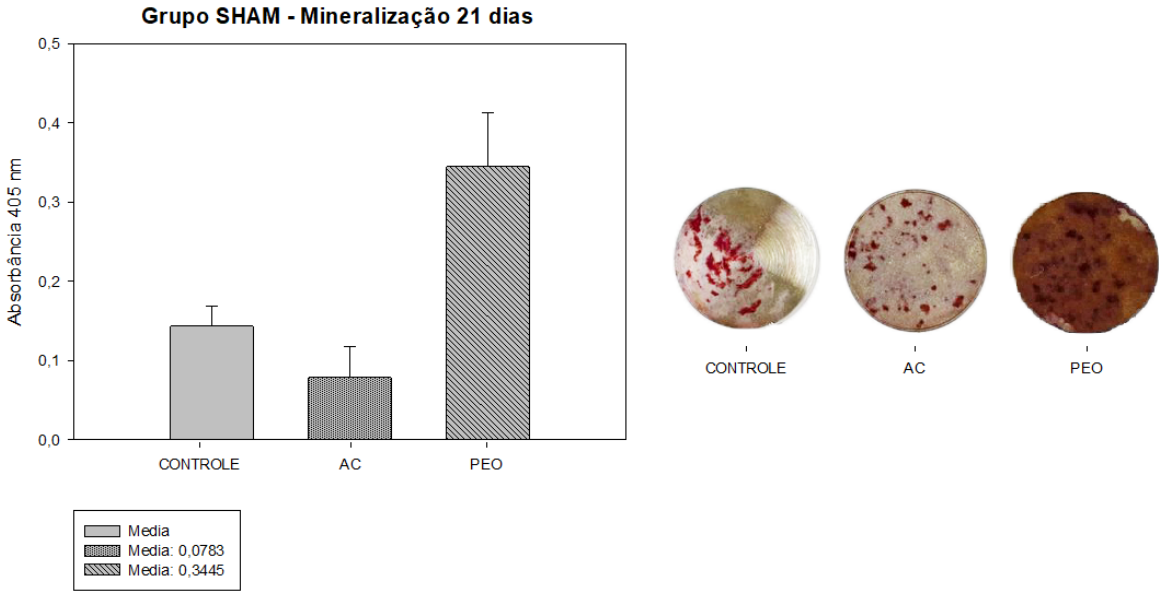


Figura 35 *– Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SHAM. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.*

No grupo de células OVX, a análise estatística apresentou significância na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.001$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.001$), não sendo encontrado diferença estatística significante na comparação dos grupos Controle x AC (Figura 36).

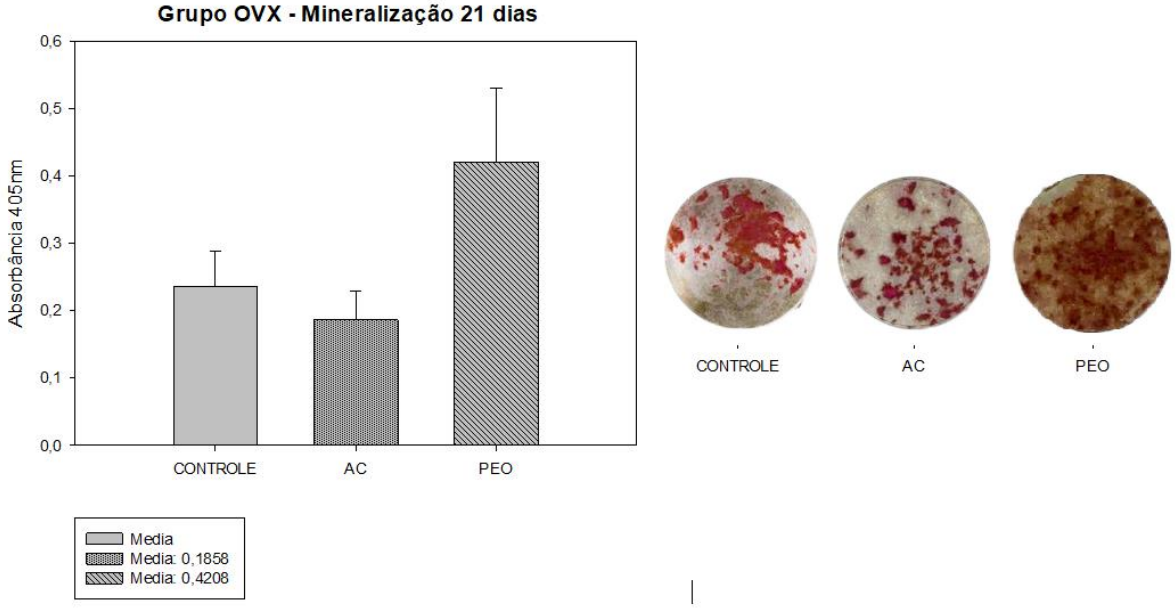


Figura 36 *– Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo OVX. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.*

Análise no grupo de células SENIL, a análise estatística apresentou significância na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.05$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.05$), não sendo encontrado diferença estatística significante na comparação dos grupos Controle x AC (Figura 37).

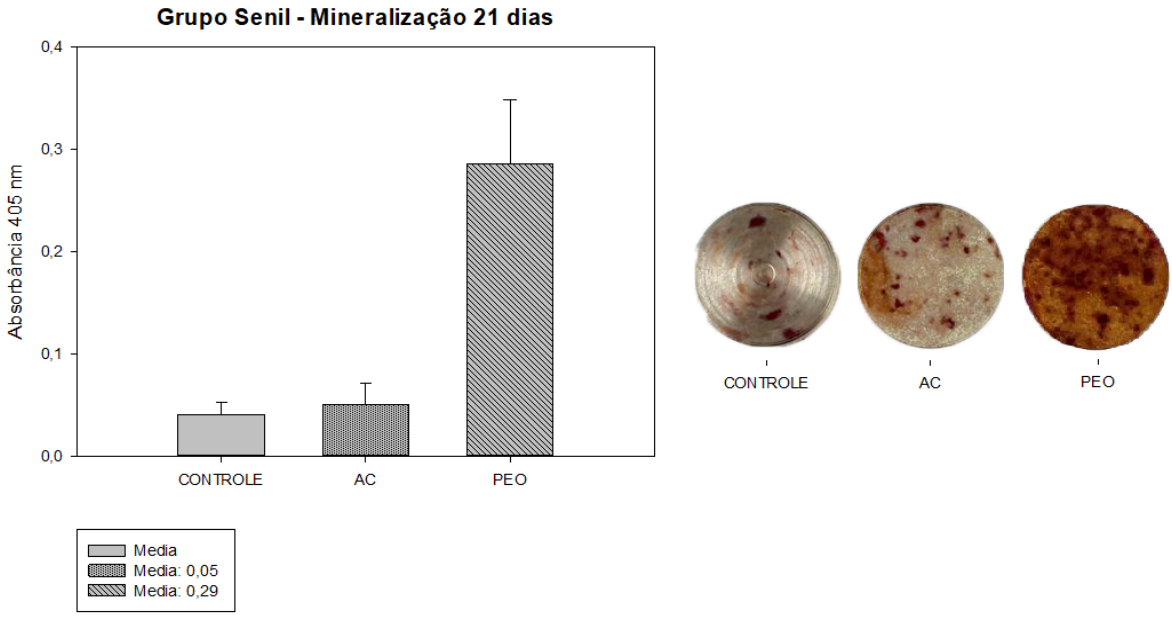


Figura 37 *– Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SENIL. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.*

Como controle do experimento de mineralização, os discos dos grupos Controle, AC e PEO, foram submetidos ao experimento, sem a presença de células para verificação do grau de retenção do corante. Ambos os grupos não apresentaram um grau de retenção significativo do corante (Figura 38).

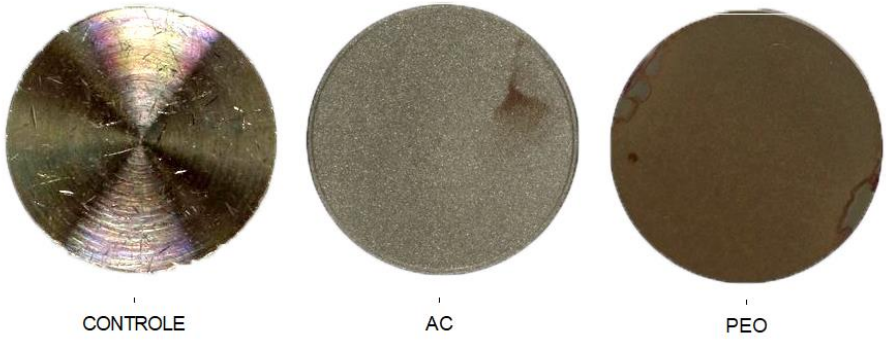


Figura 38 *– Discos sem células cultivadas dos Grupos Controle, AC e PEO coradas com Vermelho de Alizarina para avaliação do grau de retenção do corante.*

4.4 Estudo *in-vivo*

Parâmetros histológicos (coloração HE)

As fotomicrografias histológicas mostraram que na região de interface correspondente as espiras dos implantes, houve neoformação de tecido ósseo nos grupos experimentais analisados (SHAM, OVX e SENIL). Os grupos AC para as ratas SHAM e OVX apresentaram neoformação de tecido ósseo nas porções mais altas (picos) da interface osso/implante, enquanto que nas porções mais baixas (vales) da interface osso/implante uma presença maior de formação de tecido conjuntivo organizado. No grupo de ratas SENIL a neoformação de tecido ósseo em toda a topografia da região correspondente a espira dos implantes, com pouca quantidade de tecido conjuntivo organizado, tanto para AC quanto para PEO.

No grupo PEO, ao comparar com o grupo AC, apresentou melhor formação e maturação de tecido ósseo nos picos e vales e pouca presença de tecido conjuntivo para SHAM e OVX, e esta diferença foi mais discreta para o grupo SENIL (Figura 39).

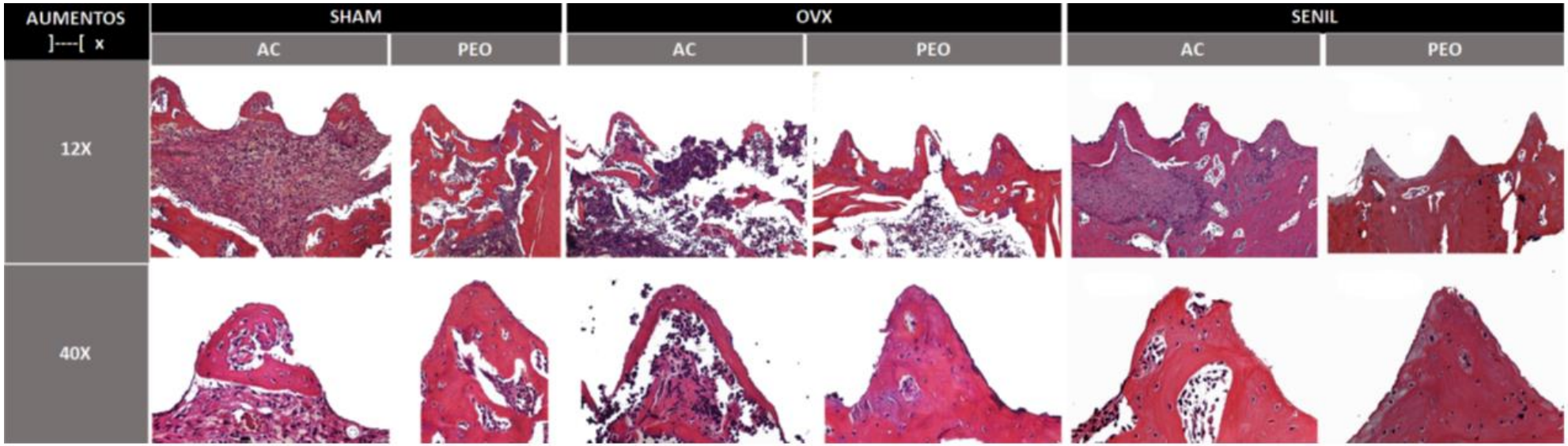


Figura 39 *- Fotomicrografia dos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) em função dos métodos de texturização dos implantes (AC e PEO) na análise histológica pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) nos aumentos de 12x e 40x.*

Parâmetros imunoistoquímicos

Grupo SHAM AC: OPG (1) – Marcação leve nas células do tecido ósseo, junto às espiras dos implantes; RANKL (1-2) – Havia mais marcações do que o observado para OPG, no entanto, não foi possível caracterizar como moderada. OC (1) – Marcação leve, discreta nas células do tecido ósseo; TRAP (1-2) - Não chega a ser moderada, mas há uma quantidade importante de osteoclastos marcados positivamente.

Grupo SHAM PEO: OPG (1) – Marcação leve, junto às células do tecido ósseo junto às espiras dos implantes; RANKL (2) - Marcação moderada, mostrado a presença desta proteína junto ao tecido ósseo em reparação; OC (1-2) - Conjuntivo marcado com Osteocalcina; TRAP (2) - Marcação moderada indicando presença de osteoclastos em atividade de reabsorção óssea (Figuras 40 a 43).

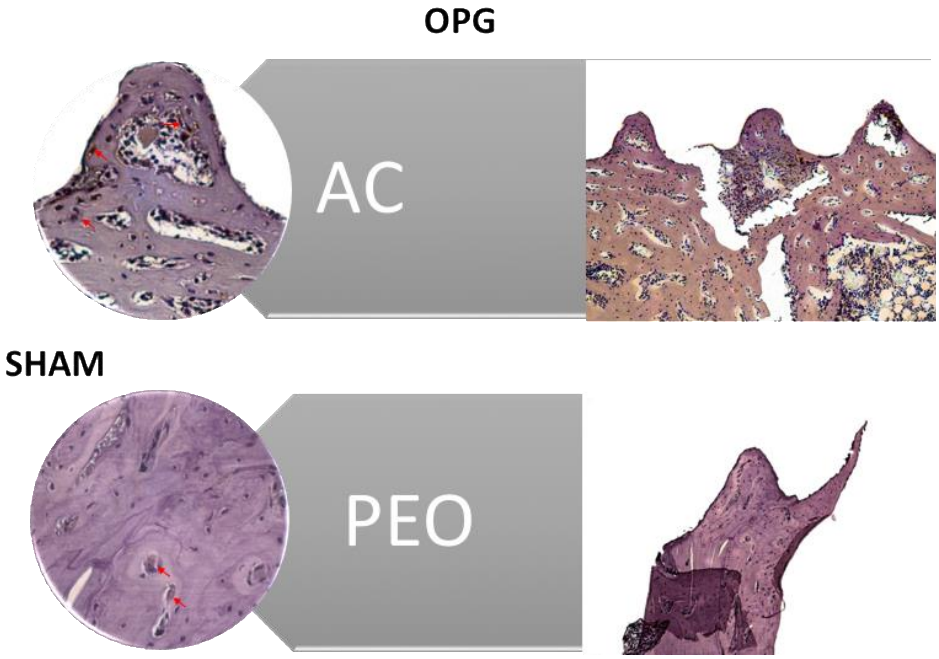


Figura 40 - *Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). (Aumentos originais 12x e 40x). *marcações: setas em vermelho.*

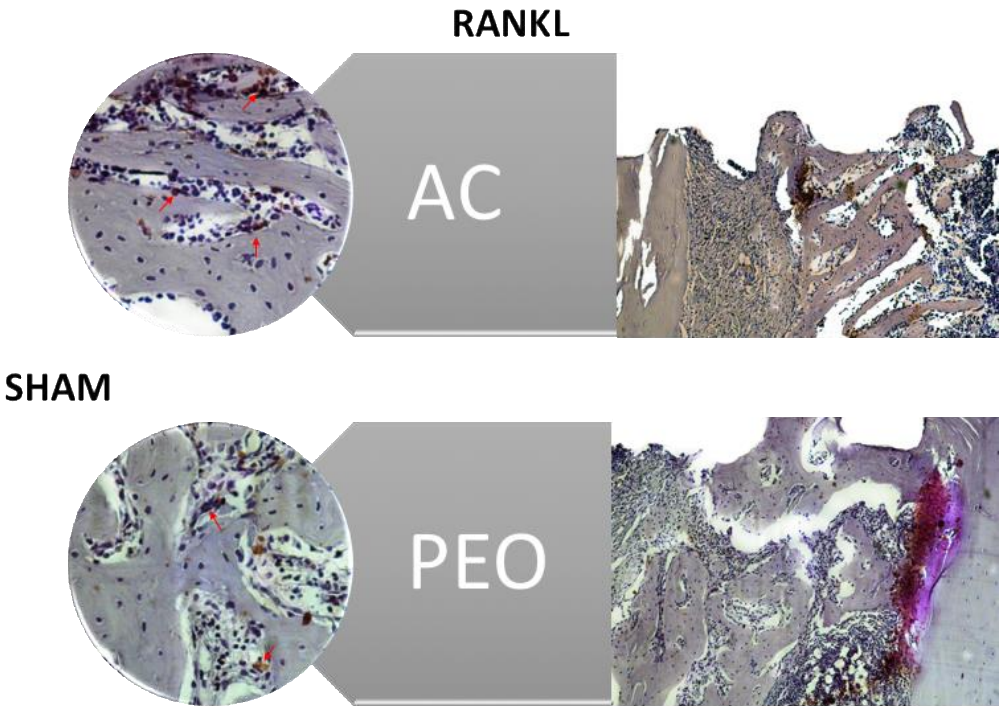


Figura 41 *- Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. * marcações: setas em vermelho.*

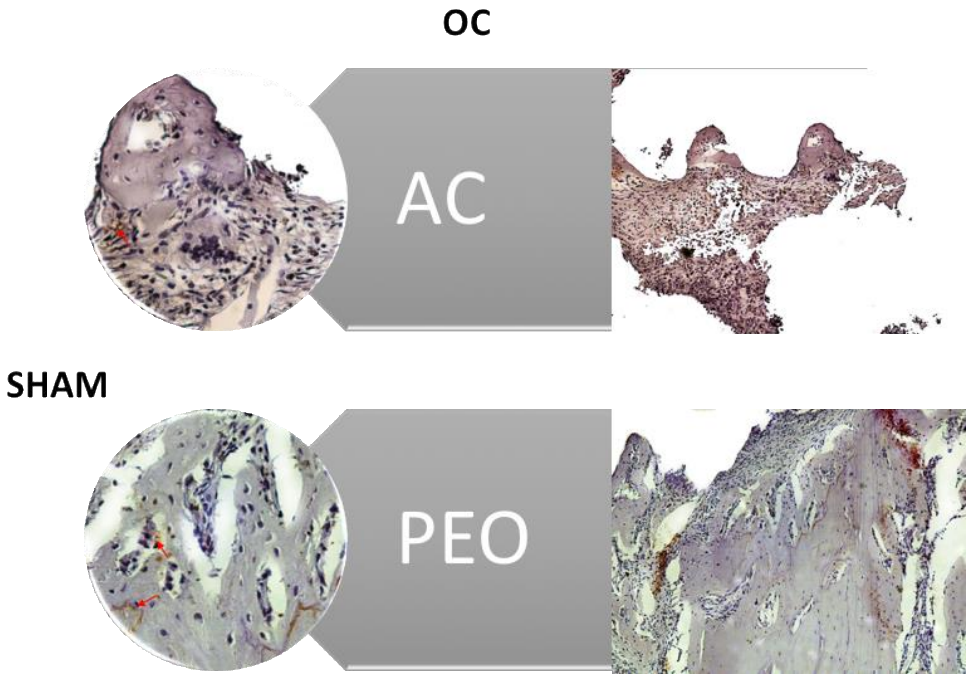


Figura 42 *- Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

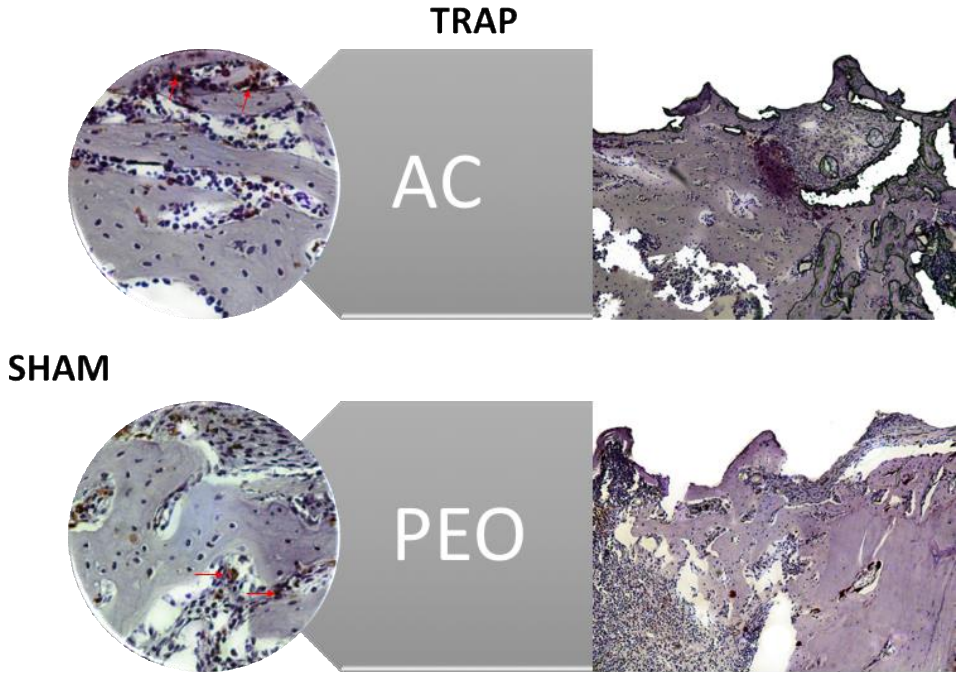


Figura 43 *- Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação de leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

Grupo OVX AC: OPG (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína; RANKL (1) - discreta marcação para RANKL; OC (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína no campo analisado; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Grupo OVX PEO – OPG (2) – marcação moderada para esta proteína, junto a osteoblastos próximos às espiras dos implantes; RANKL (0-1) - marcação ausente à leve na interface osso-implante; OC (1-2), marcação de leve a moderada para osteocalcina, mostrando marcação desta proteína no tecido ósseo em reparação; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção (Figuras 44 a 47).

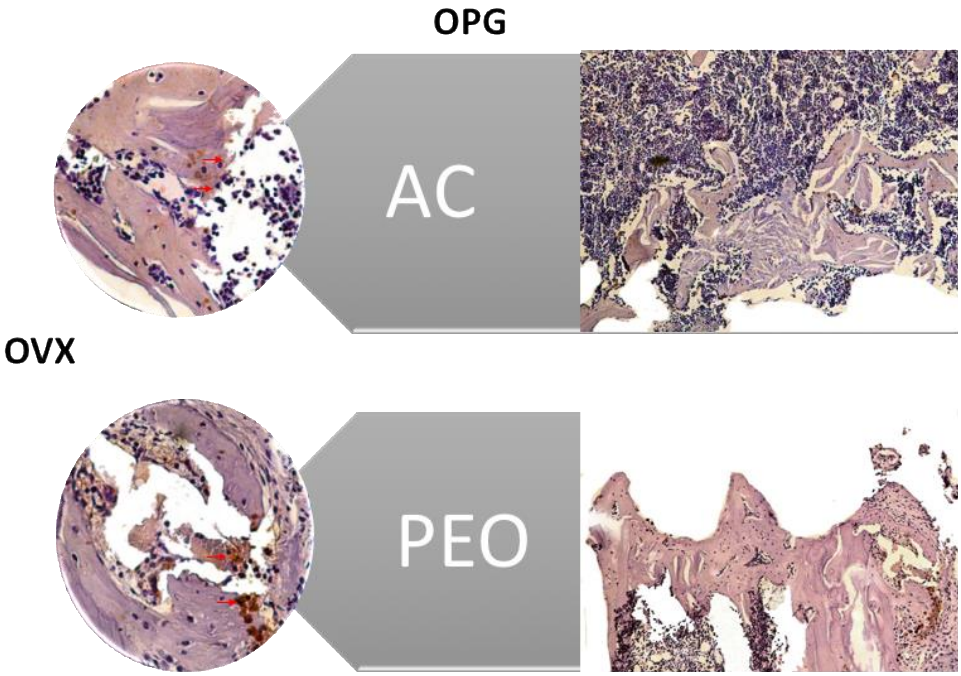


Figura 44 *- Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

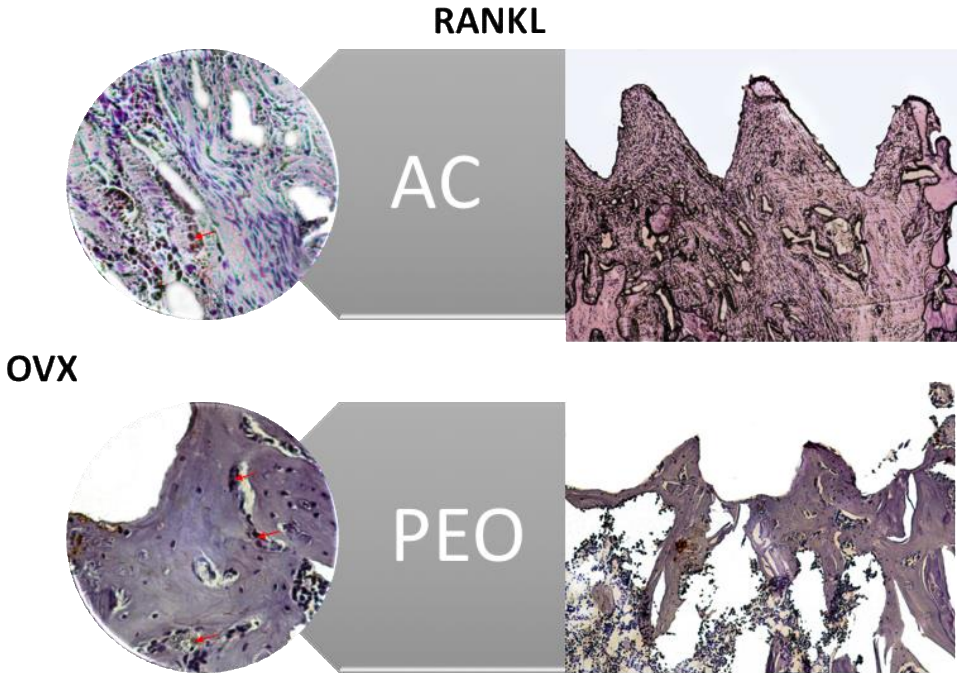


Figura 45 *- Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo OVX AC: 1 (marcação leve); Grupo OVX PEO: 0-1 (marcação ausente à leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.*

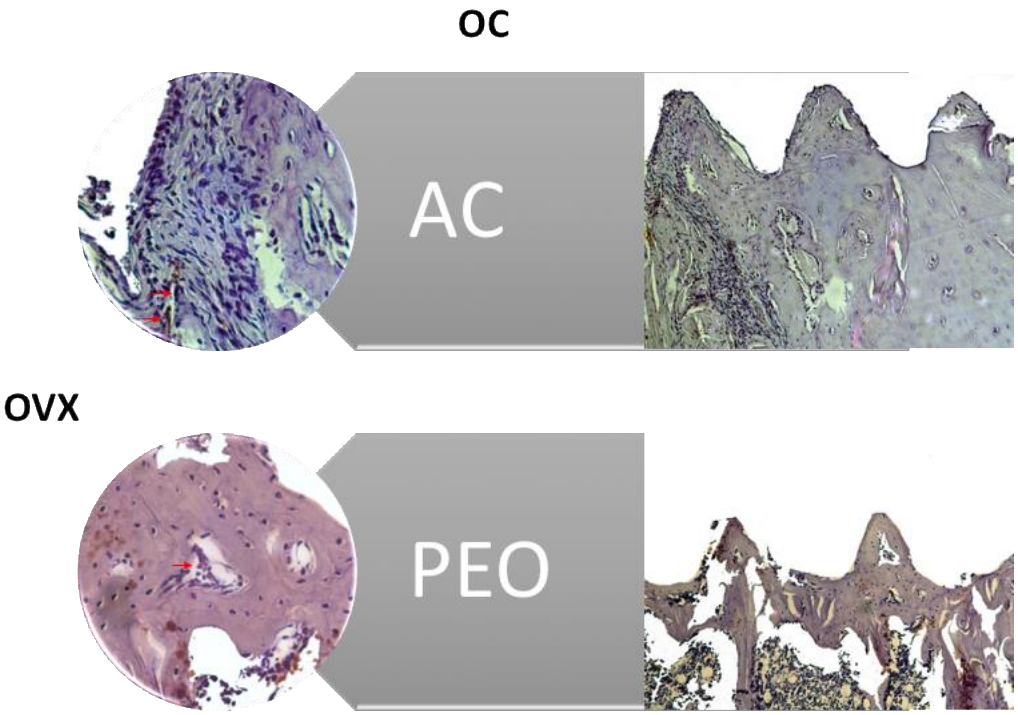


Figura 46 *- Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

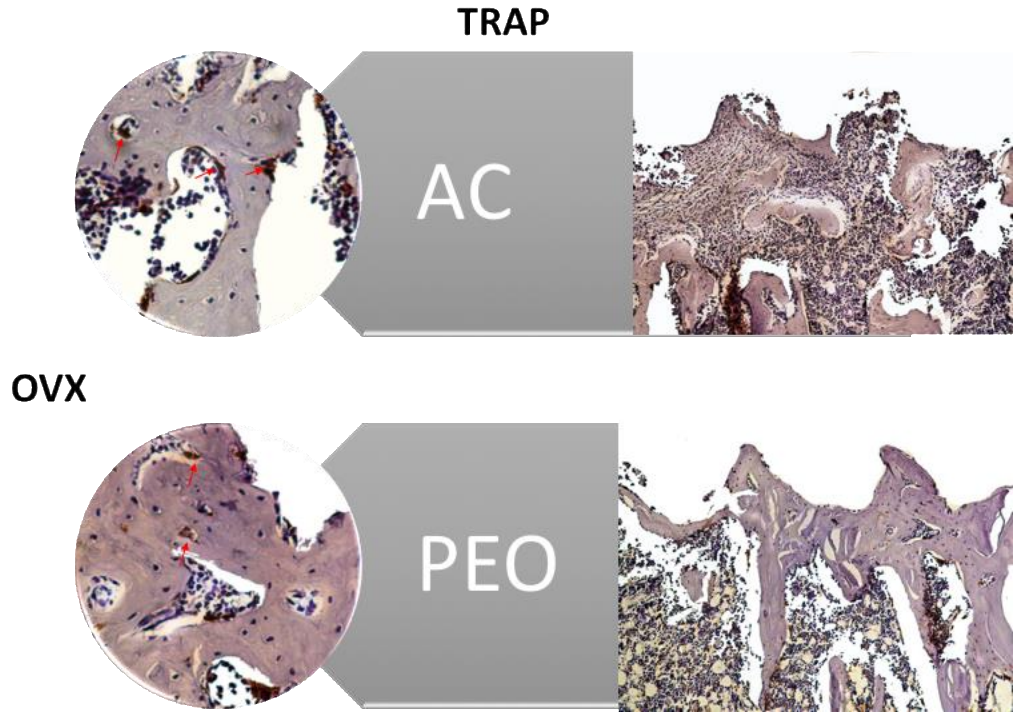


Figura 47 *- Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP.*

*Grupo OVX AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve a moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.*

Grupo SENIL AC: OPG (1) – marcação bastante discreta para esta proteína; RANKL (1-2) - marcação leve para moderada para RANKL; OC (1) – marcação bastante discreta para esta proteína no campo analisado; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Grupo SENIL PEO – OPG (1-2) – marcação leve para moderada para esta proteína; RANKL (1-2) - marcação moderada mais presentes na interface osso-implante; OC (1), marcação de leve para osteocalcina; TRAP (1) – marcação leve para osteoclastos em atividade de reabsorção na interface do implante (Figuras 48 a 51).

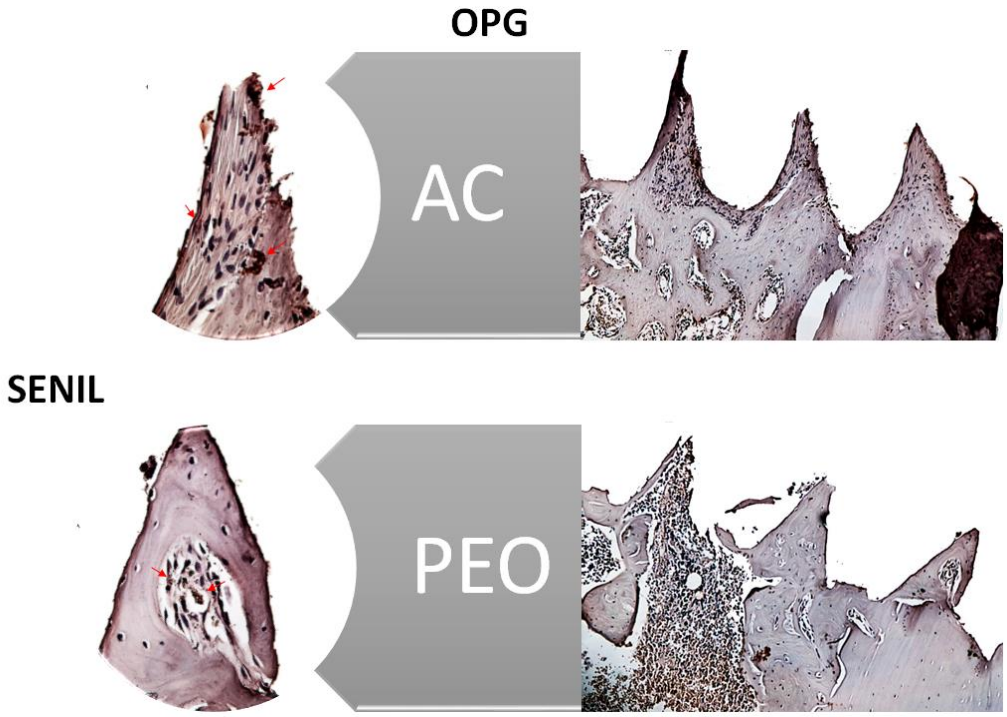


Figura 48- *Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

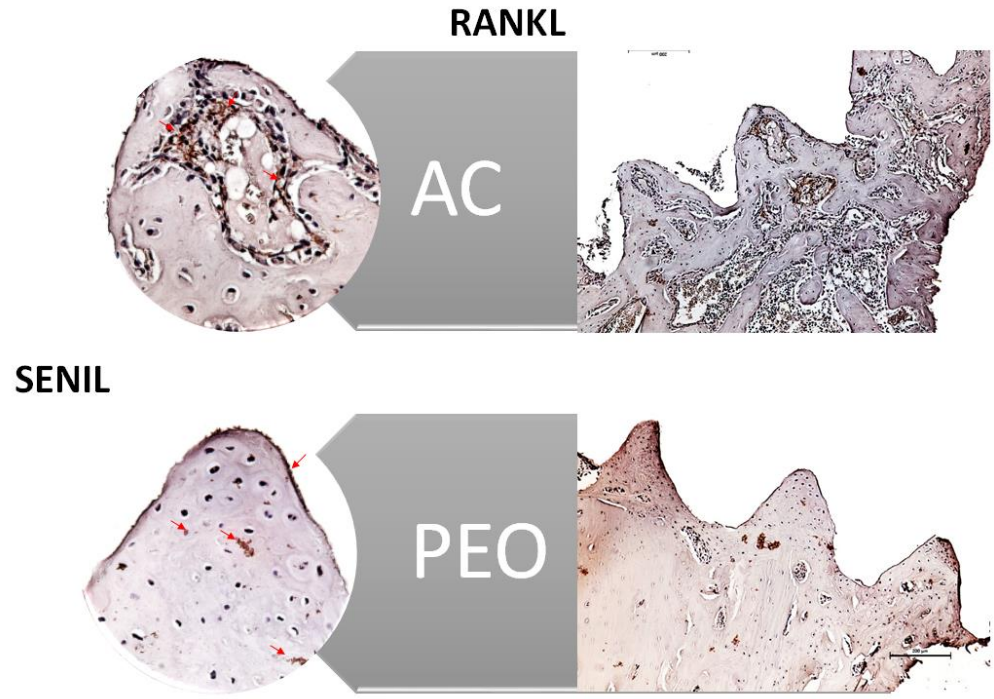


Figura 49 *-Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína RANKL. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

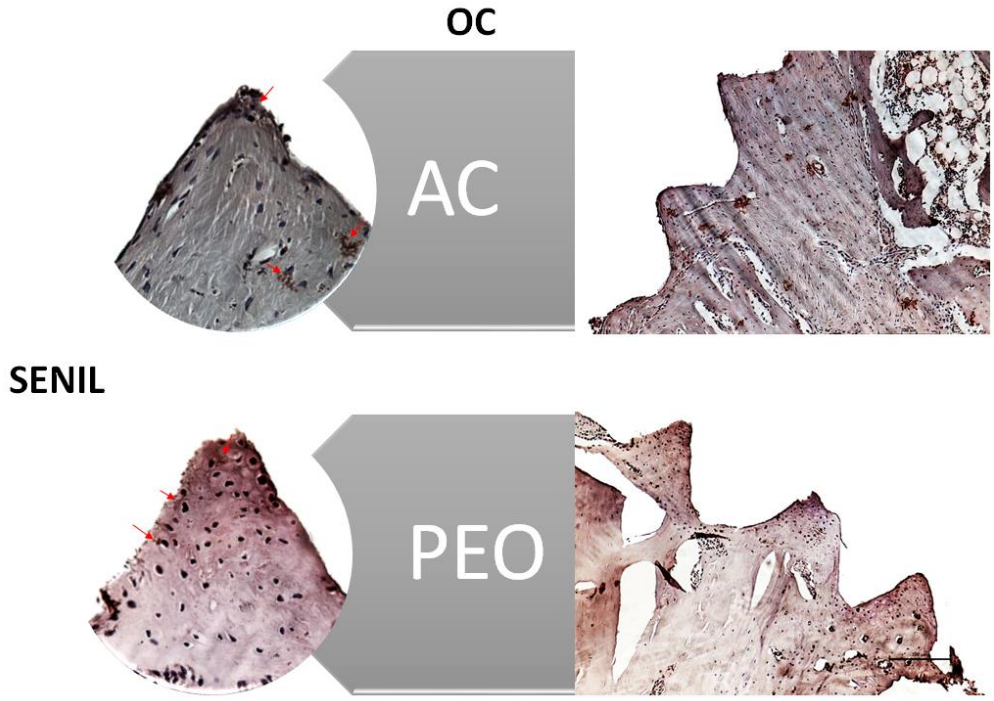


Figura 50*- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.*

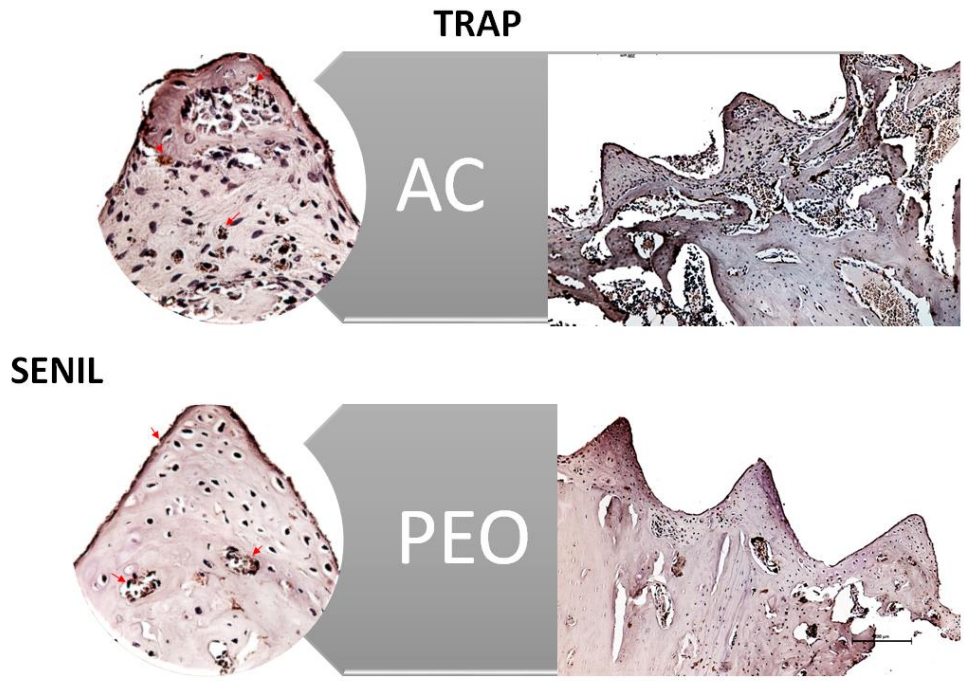


Figura 51 *- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.*

Os valores representativos do escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Representaçãodos escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP para cada grupo experimental.

	Proteínas			
Grupos	**OPG**	**RANKL**	**OC**	**TRAP**
SHAM AC	1	1-2	1	1-2
SHAM PEO	1	2	1-2	2
OVX AC	0-1	1	0-1	1-2
OVX PEO	2	0-1	1-2	1-2
SENIL AC	1	1-2	1	1-2
SENIL PEO	1-2	1-2	1	1-2

Para OPG, somente a interação OVX AC vs OVX PEO mostrou significância estatística ($p<0,05$), com maior marcação para OVX PEO, enquanto que para os demais, houve similaridade das marcações para esta proteína ($p>0,05$). Para RANKL, o grupo SHAM PEO apresentou maior intensidade de imunomarcação em comparação ao grupo SHAM AC ($p<0,05$), enquanto que para as demais comparações, houve similaridade das marcações para esta proteína ($p>0,05$). Para OC, as comparações estatísticas não mostraram significância ($p=0,0716$), entretanto a imunomarcação para os grupos PEO (SHAM e OVX) foi um pouco mais moderada em relação aos demais grupos, que apresentaram levemente marcadas para a maioria das amostras e até com ausência de marcação para algumas amostras do grupo OVX AC. Para TRAP, todas as comparações foram bem similares entre os grupos ($p=0,3916$).

Assim, independente das proteínas avaliadas, o comportamento imunoistoquímico das respostas reparacionais no osso de ratas do grupo SENIL foi similar tanto para a superfície AC quanto PEO ($p>0,05$).

Parâmetros microtomográficos (micro CT)

A representação tridimensional do osso periimplantar escaneado pela microtomografia podem ser visualizadas na Figura 52.

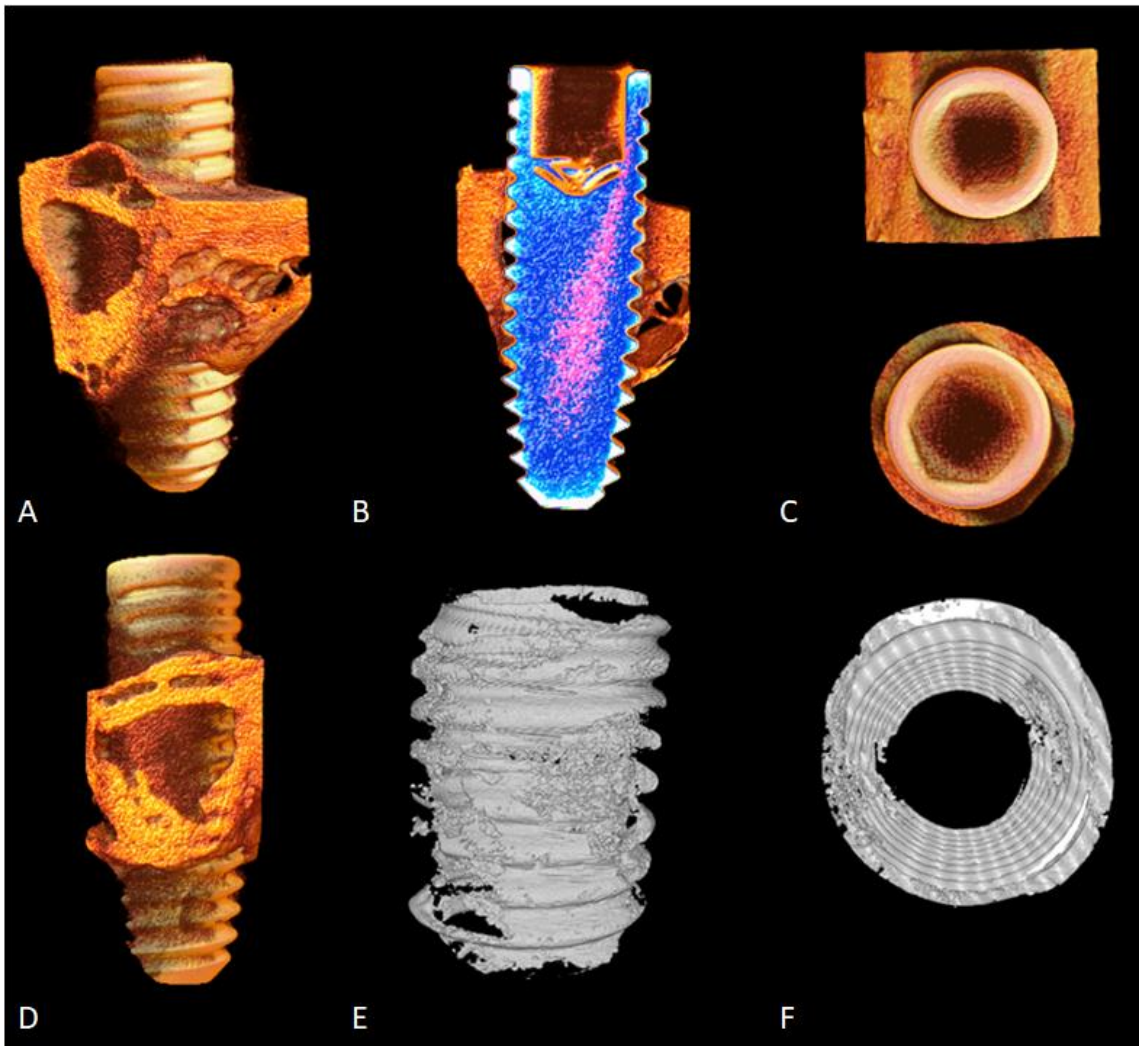


Figura 52 *– Imagem representativa da reconstrução obtida pela microtromografia. (A) Reconstrução; (B) Corte medial do implante; (C) Seleção da região de interesse (ROI); (D) Implante com área de osso neoformado após seleção do ROI; (E e F) Área de osso neoformado analisado.*

Na análise do parâmetro BV.TV na comparativa dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) não apresentaram significância estatística nos grupos SHAM (p=0,726), OVX (p=0,428) e SENIL (p= 0,411) (Figura 53).

A porosidade total – Po (tot), apresentou-se levemente maior nos grupos SHAM PEO, OVX AC e SENIL PEO (Figura 52). A comparação entre AC e PEO não apresentou

significância estatística nos grupos SHAM (p= 0,350), OVX (p= 0,428) e SENIL (p= 0,408).

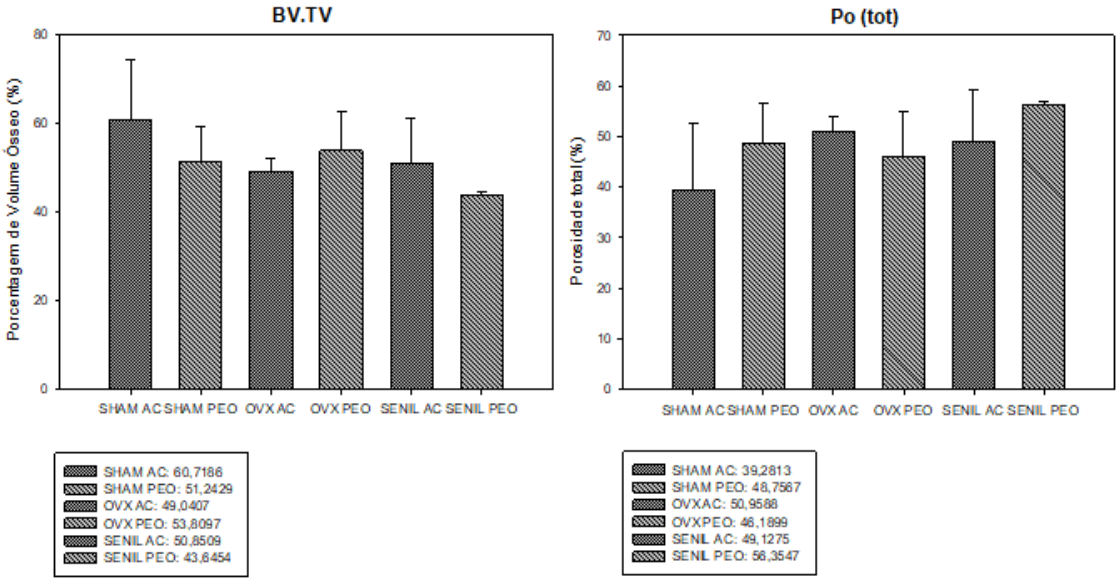


Figura 53 *- Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos: Bv.Tv (porcentagem do volume ósseo) e Po(tot) (porcentagem da porosidade total).*

Em relação aos parâmetros números de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th) e separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp), houve similaridade entre os tratamentos de superfícies (AC e PEO) (p>0,05) (Figura 54).

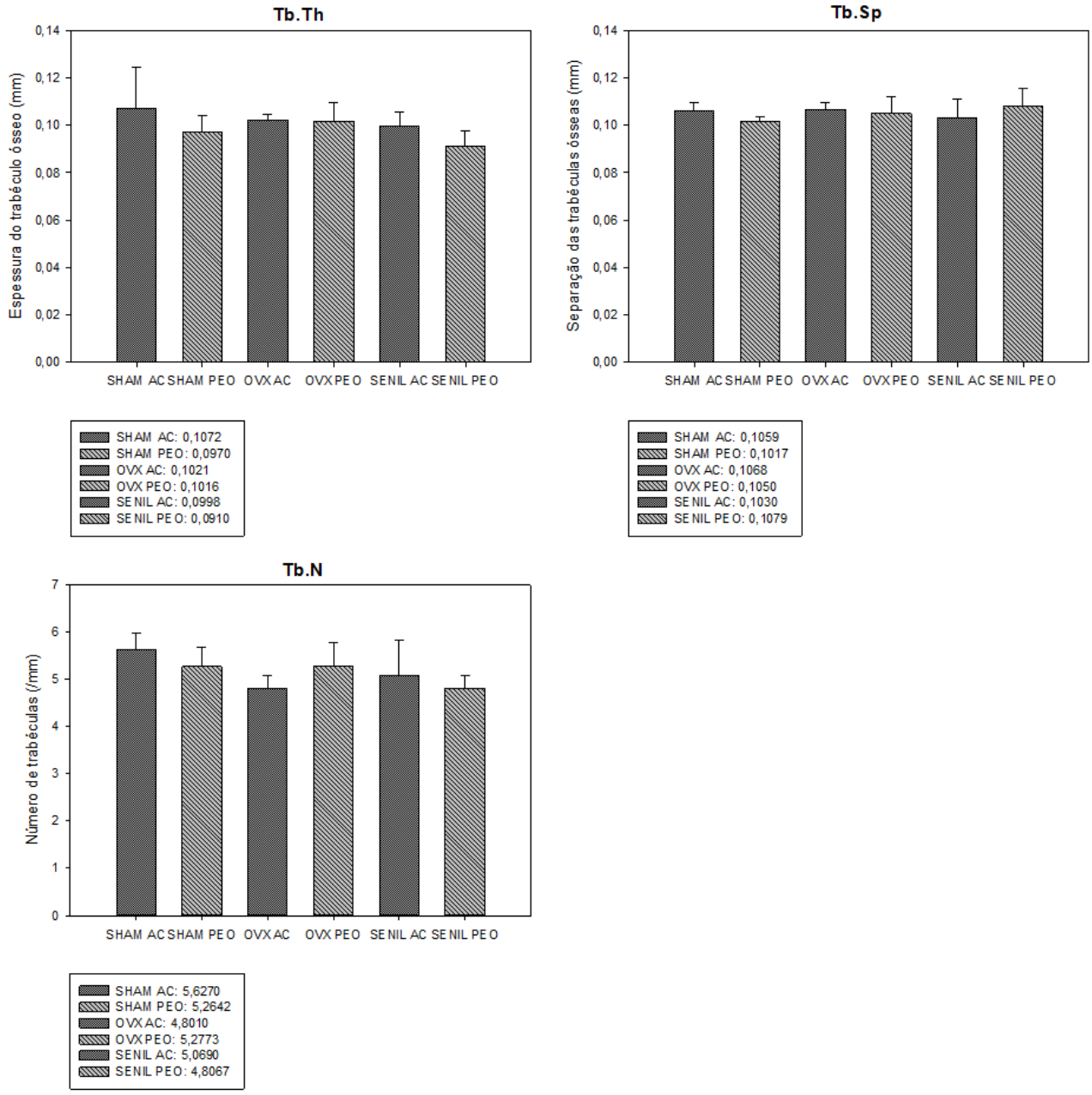


Figura 54 *- Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos. (a)Tb.Th; (b)Tb.Sp; (c) Tb.N*

Grupo SHAM - Tb.Th (p= 0,402); Tb.Sp (p= 0,161);Tb.N (p= 0,312).

Grupo OVX - Tb.Th (p= 0,915); Tb.Sp (p= 0,703); Tb.N (p= 0,221).

Grupo SENIL- Tb.Th (p= 0,222); Tb.Sp (p= 0,536) Tb.N (p= 0,677).

Análise Biomecânica (torque reverso)

Na análise intragrupos (OVX e SHAM), os valores de torque reverso (N.cm) foram maiores para os grupos PEO (SHAM= 7,25+/- 1,7 N.cm; OVX= 5,75+/- 1,7 N.cm)

em comparação aos grupos AC (SHAM= 4+/- 0,81 N.cm; OVX= 2+/- 1,4 N.cm) ($p<0,05$). O torque reverso mostrou similaridade estatística nas ratas do grupo SENIL, independentemente do tipo de texturização ($p=0,299$, Mann-Whitney) (Figura 55).

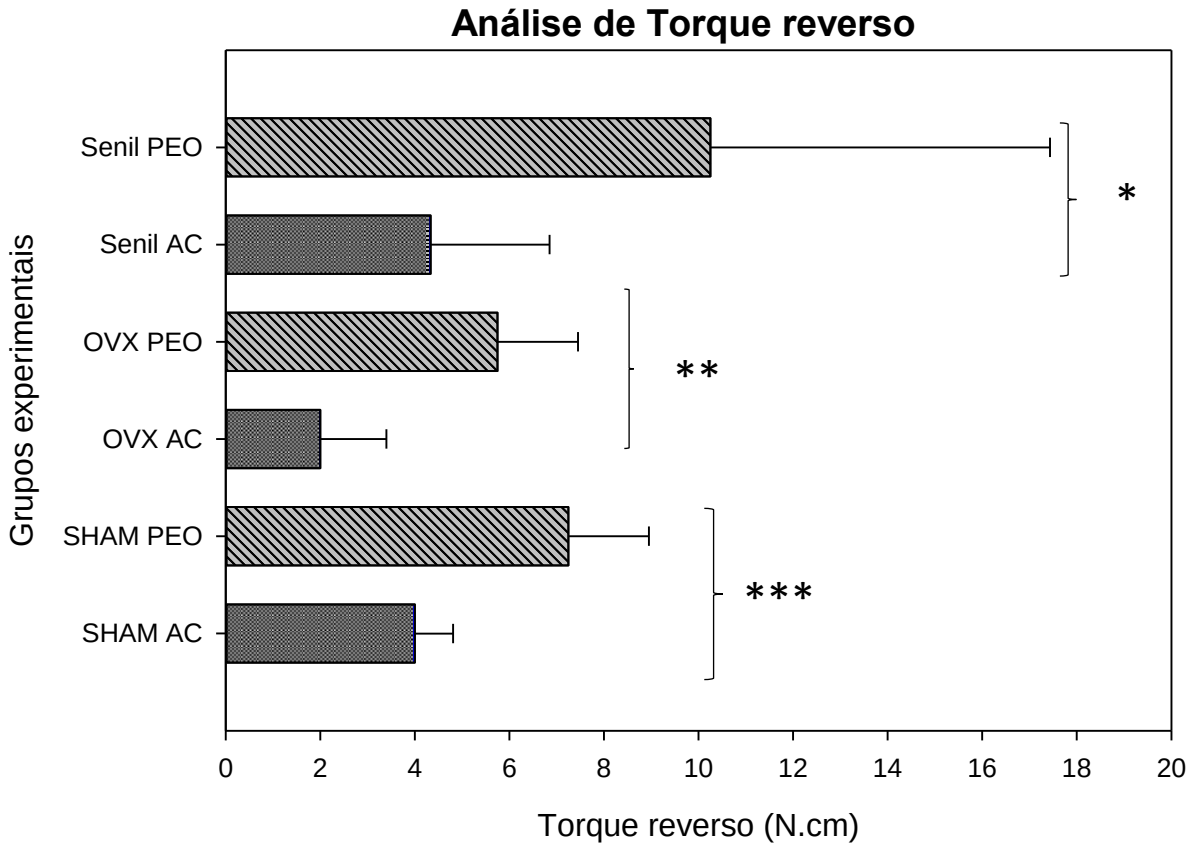


***Figura 55 - Análise de Torque reverso**: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (N.cm) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).*

** Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) p= 0,229.*

*** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p<0,05.*

**** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p<0,05.*

Microscopia Confocal a laser (dinâmica do osso periimplantar)

A representação das imagens escaneadas em microscopia confocal à laser, podem ser visualisadas na Figura 56.

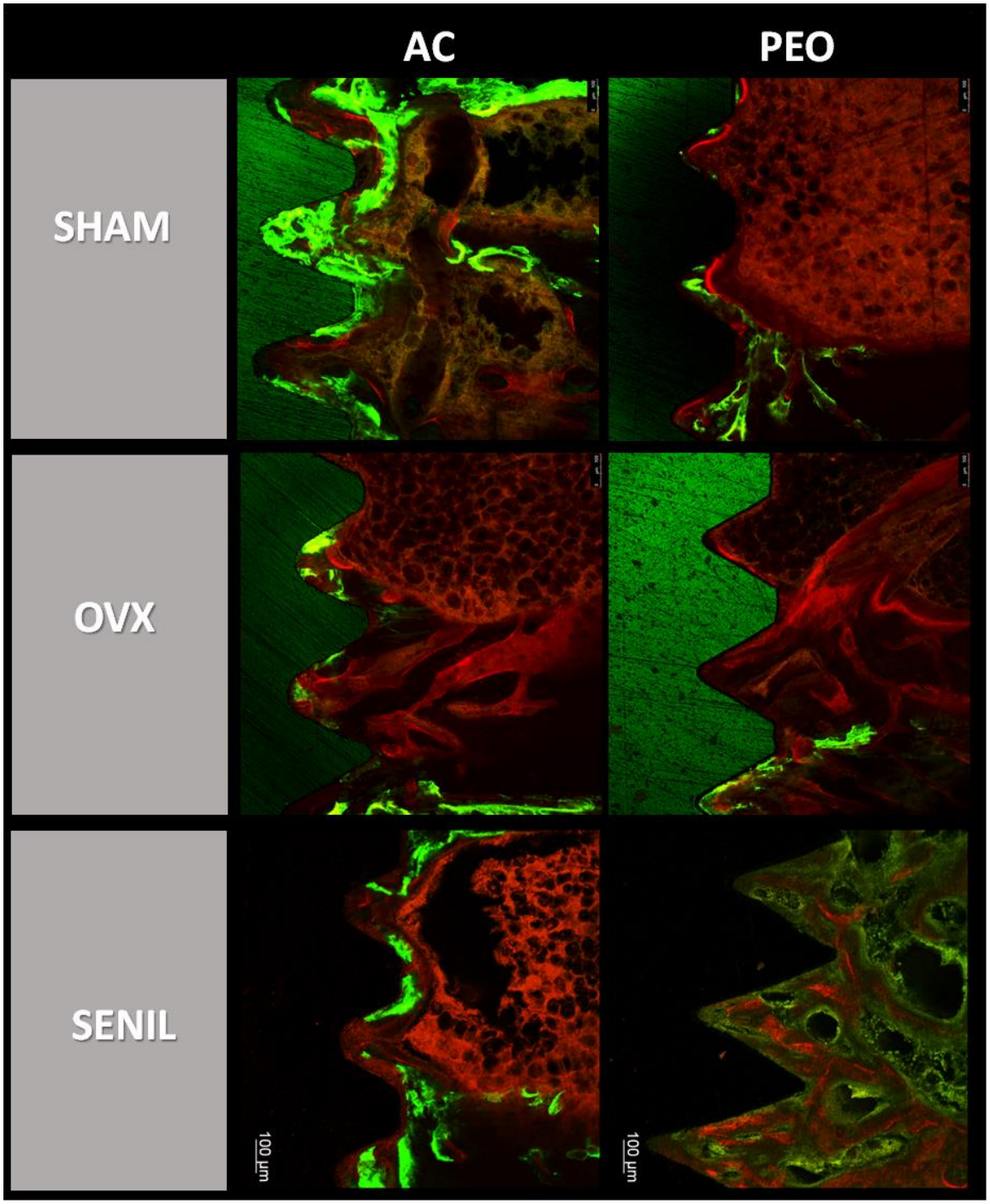


Figura 56 *- Imagem da microscopia confocal à laser dos grupos experimentais.*

Na análise do dinamismo ósseo periimplantar, a marcação por Calceína foi maior nos grupos SHAM AC, OVX PEO e SENIL AC. Em comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos, não houve significância estatística para SHAM (p= 0,299), para OVX (p=0,614) e para SENIL (p= 0,100) (Figura 57).

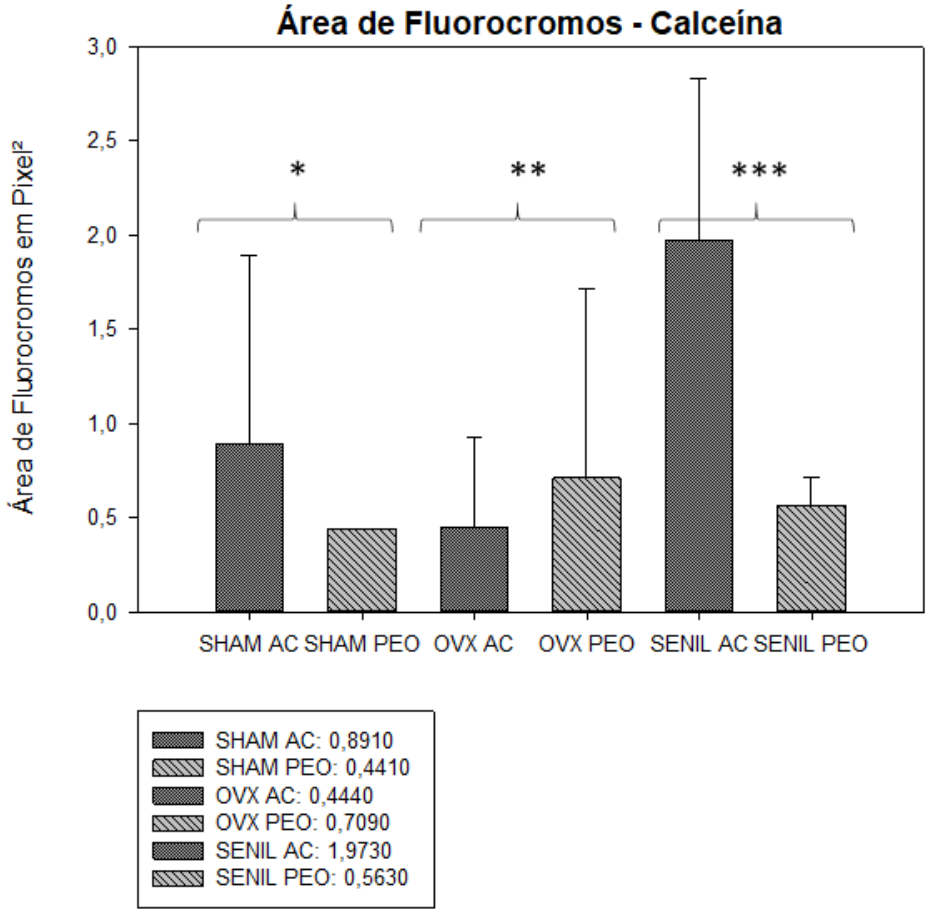


Figura 57 *– Área de Fluorocromos - Calceína: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).*

** Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) p= 0,294.*

*** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p=0,614.*

**** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p=0,100.*

A marcação de Alizarina apresentou-se similar nos grupos SHAM e OVX, sendo maior evidenciada no grupo SENIL PEO. Em comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos, não houve significância estatística para SHAM (p= 0,685), para OVX (p=0,899) e para SENIL (p= 0,627) (Figura 58).

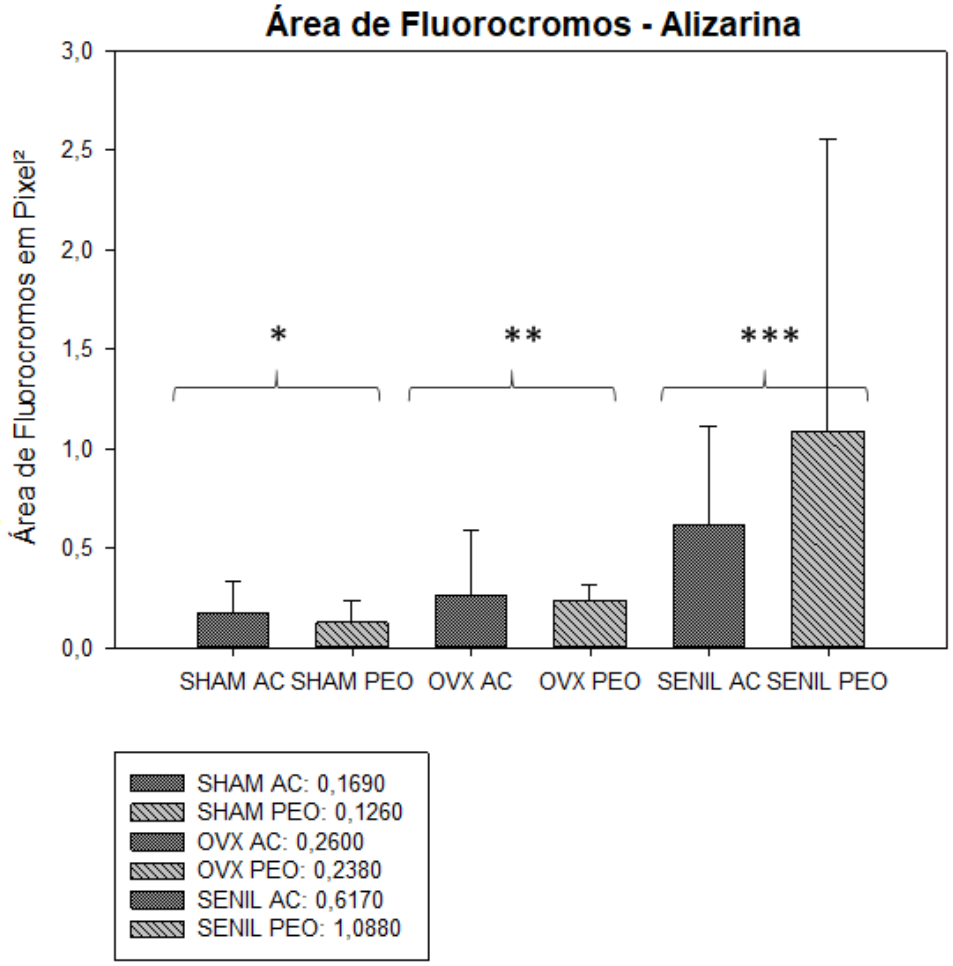


Figura 58 - *Área de Fluorocromos - Alizarina: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).*

** Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) p= 0,685.*

*** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p=0,899.*

**** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) p=0,627.*

A comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais, não foi evidenciada significância estatística para os tratamentos de superfícies (AC e PEO): SHAM (p = 0,242), OVX (p=0,624) e SENIL (p= 0,387). Porém, a interação dos fluorocromos (Calceína vs alizarina) nos grupos experimentais, houve significância estatística no grupo SHAM (p=0,026), com maior precipitação de Calceína. Os grupos OVX (p=0,203) e SENIL (p=0,441) não apresentaram diferença na significância estatística (Figura 59).

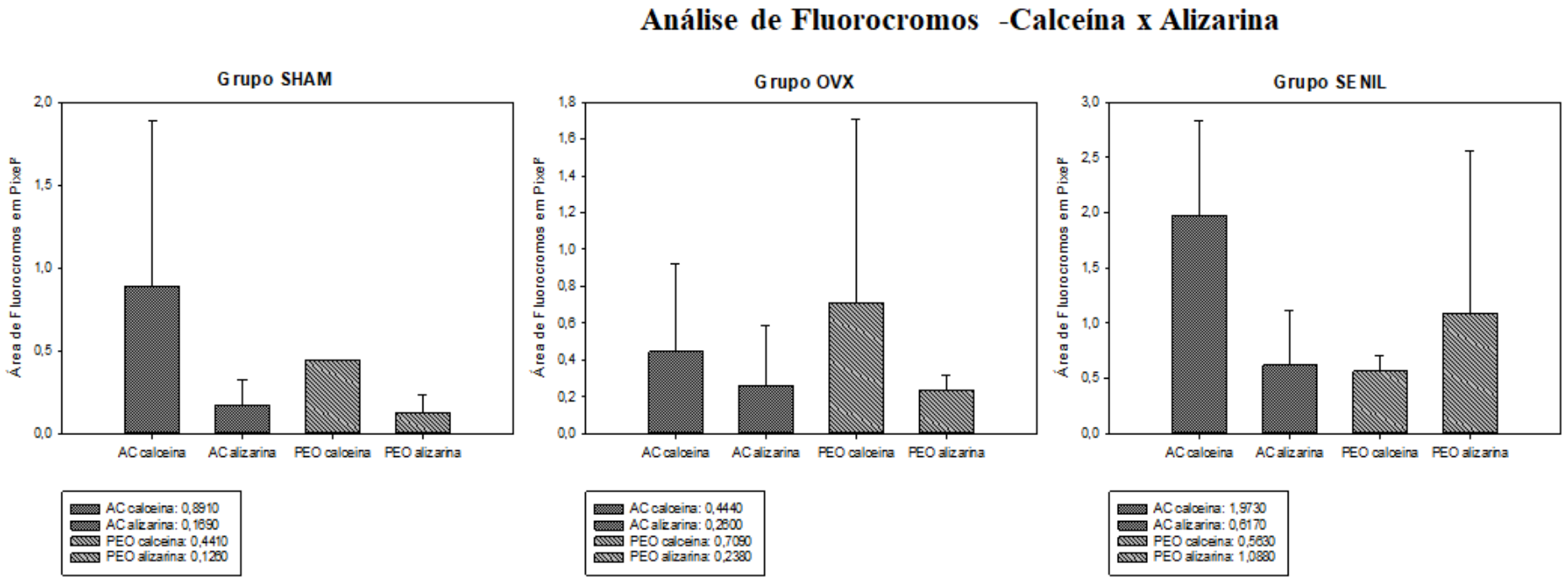


Figura 59 *- Análise de Fluorocromos: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) na comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).*

Em relação a taxa de aposição mineral (MAR) diária, houve uma similaridade dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) nos grupos OVX e SENIL, e uma maior tendência no grupo SHAM PEO em relação ao grupo SHAM AC. Porém não foi evidenciada significância estatistica na comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos SHAM (p= 0,211), OVX (p= 0,795) e SENIL (p= 0,771) (Figura 60).

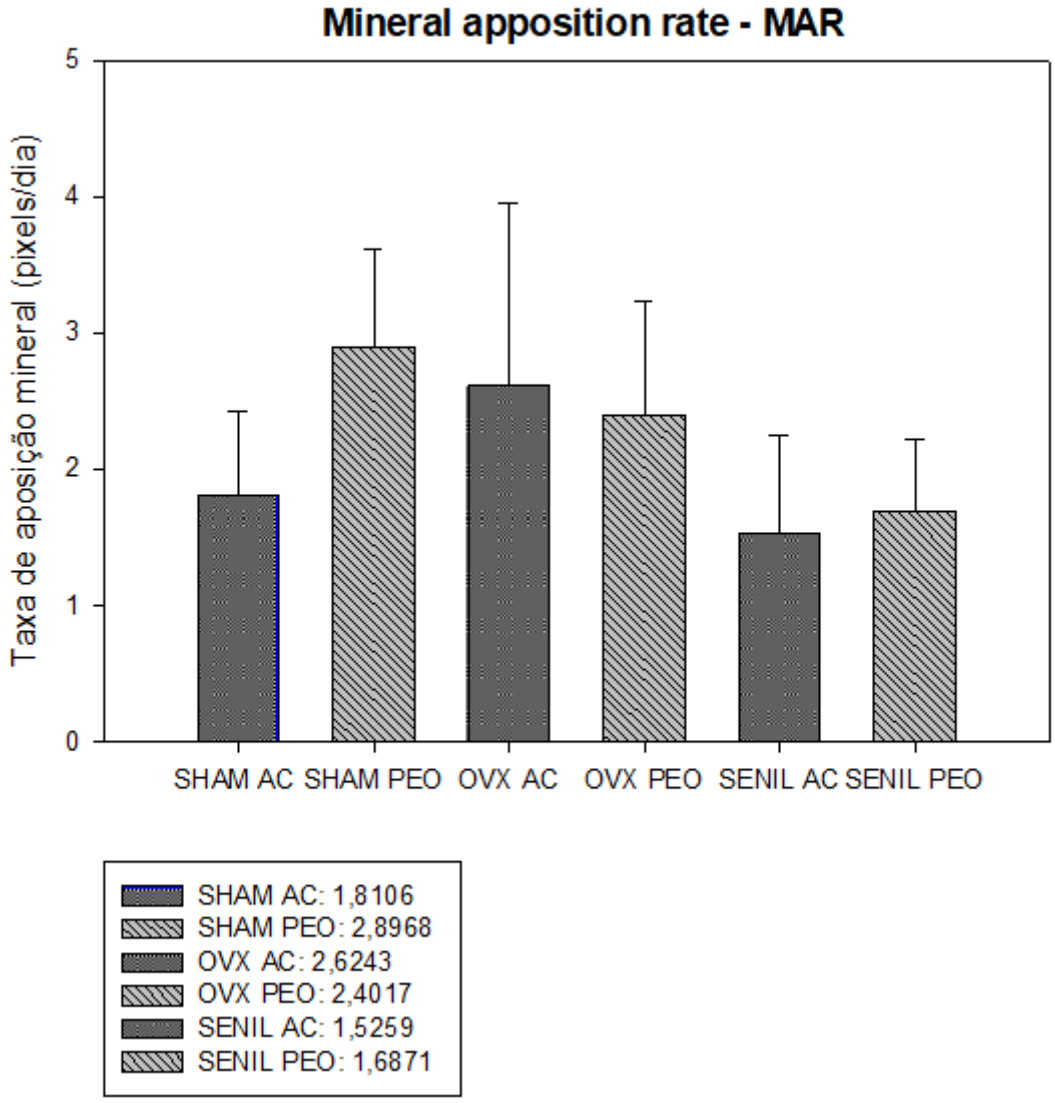


Figura 60 – *Taxa de aposição mineral (MAR – mineral apposition rate): Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel/dia) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).*

Histometria

A representação das imagens obtidas para a histometria pode ser visualisada na Figura 61.

A análise da extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) não mostraram significância estatística (Anova um fator) ao comparar as superfícies AC e PEO, nos grupos SHAM (p= 0,758), OVX (p= 0,374) e SENIL (p= 0,258) (Figura 62 A).

Para a análise da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante, também não apresentou significância estatistica (ANOVA um fator) ao comparar o tratamento de superfícies AC e PEO, nos grupos SHAM (p= 0,682), OVX (p= 0,751) e SENIL (p= 0,695) (Figura 62 B).

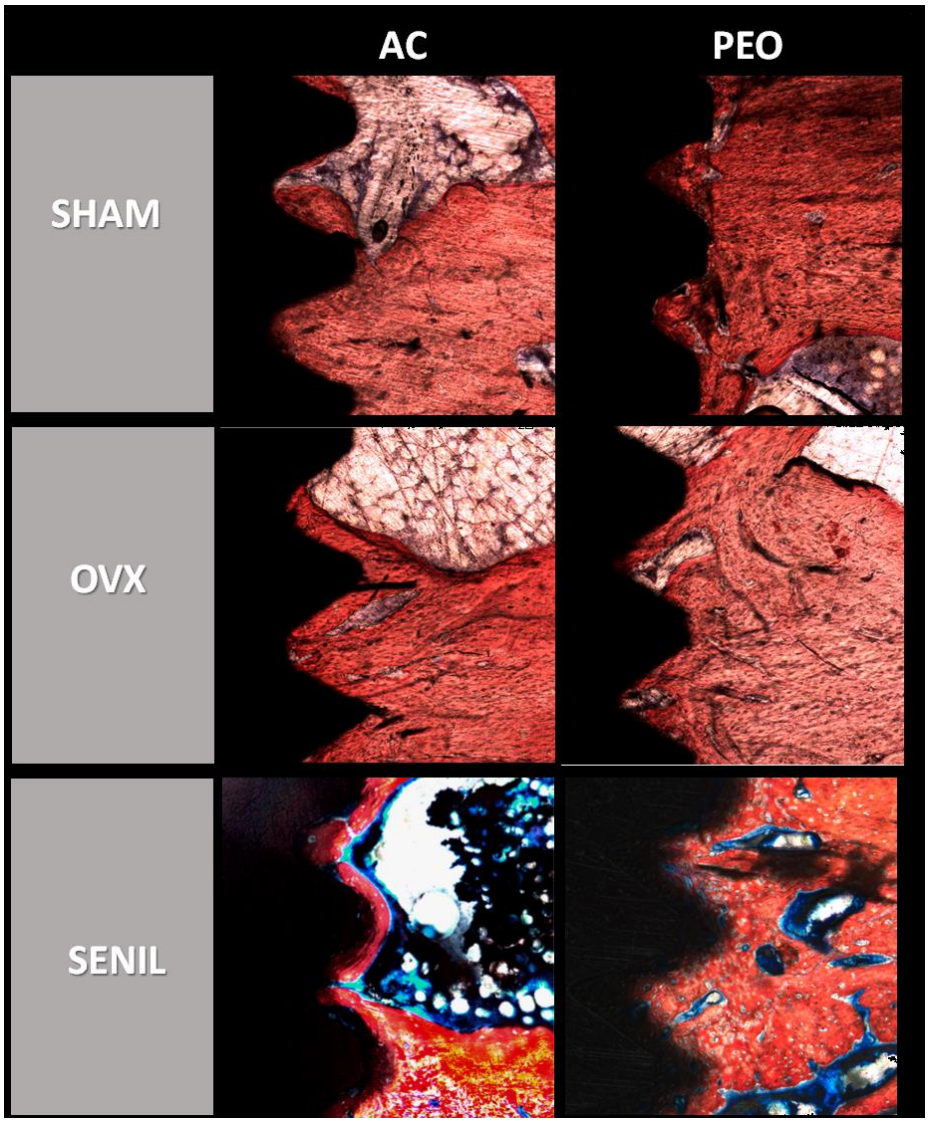


Figura 61 *– Imagens dos grupos experimentais para análise histométrica.*

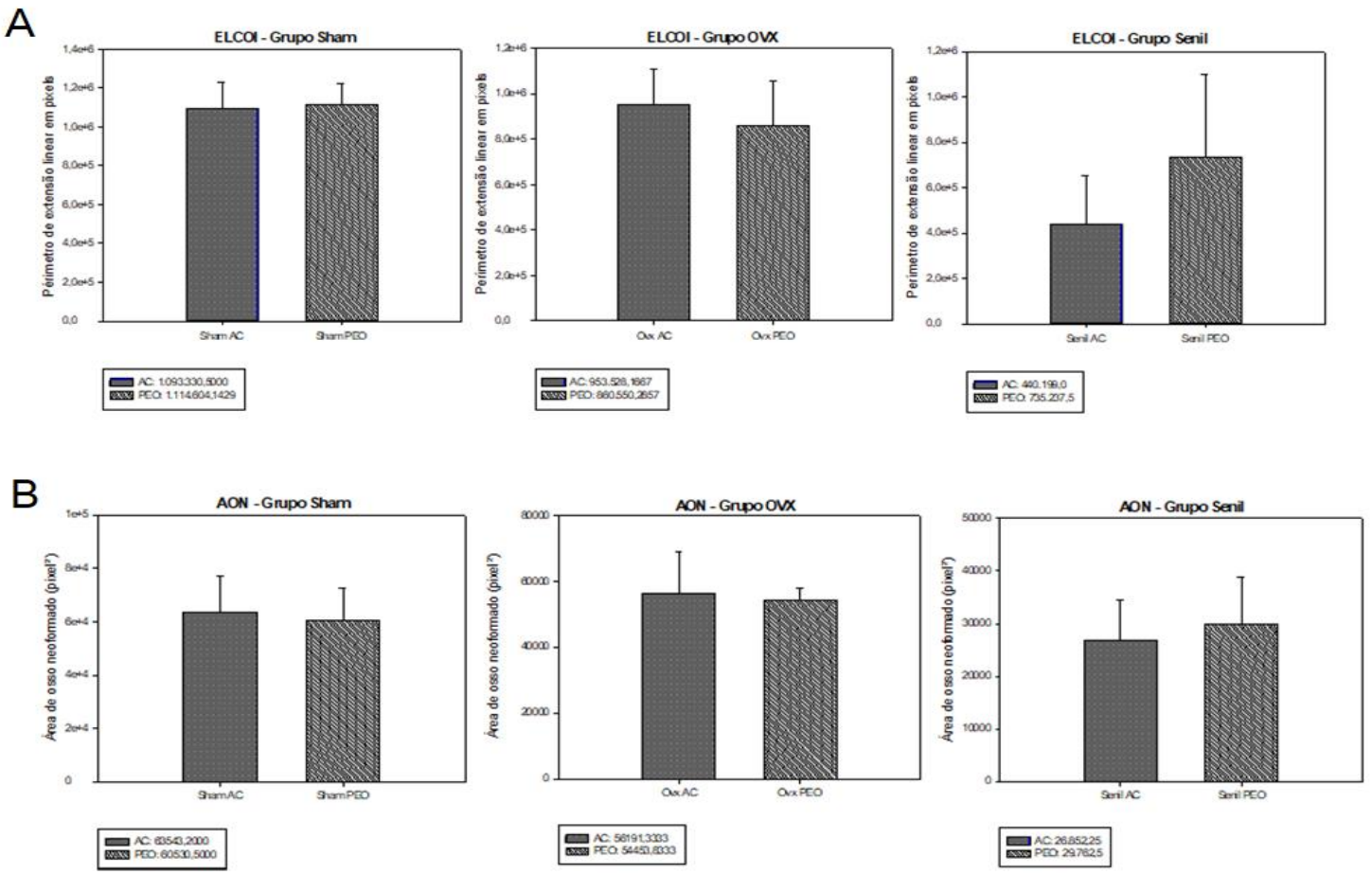


Figura 62 *– (A) - Análise da extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). (B) análise da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante nos grupos experimentais (SHAM, OVX e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

Discussão

5. DISCUSSÃO

A alteração na topografia de superfície dos implantes osseointegráveis tem como objetivo melhorar suas propriedades mecânicas, resistência à corrosão em fluidos biológicos e a as respostas biológicas reparacionais do tecido ósseo. Estudos recentes, demonstram que assim como outros materiais usados em condições fisiológicas, sua exposição a fatores mecânicos e biológicos podem prejudicar a sobrevivência do implante e o sucesso do tratamento [61]. As ligas de titânio, como a liga Ti-6Al-4V vem sendo associadas à liberação de vanádio na corrente sanguínea e urina, e o alumínio mostrou-se presente no tecido cerebral em pacientes com Alzheimer. Esses elementos ocasionam uma iniciação da cascata inflamatória, levando a osteólise, efeitos neurológicos e uma resposta negativa na viabilidade celular [61-64].

Estudos anteriores de caracterização de superfície através do PEO, demonstram que nas superfícies tratadas através do método, produz uma camada de óxido que confere uma maior resistência ao desgaste e à corrosão, produz uma proteção térmica e a possibilidade de uma boa aderência de íons importantes para a osseointegração, como a associação de Ca e P. Essa incorporação de Ca e P mostraram uma estrutura cristalina mais homogênea, além de poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela MEV, além de promover propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos [2, 24, 25, 29].

Marques et al. (2015) relatam uma melhor proliferação de células tronco mesenquimais nos testes de cultura de células em superfícies tratadas por PEO [29]. O teste de viabilidade celular encontrada em nosso estudo mostrou resultados positivos para a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs-MO) nos discos tratados com o PEO. Em todos os grupos testes de CTMs-MO (SHAM, OVX, SENIL) apresentou um crescimento progressivo dentro dos tempos de 3, 7 e 10 dias.

As CTMs provenientes de medula óssea possuem a capacidade de diferenciação em osteoblastos, apesar dos possíveis distúrbios osteogênicos, assim mesmo é melhor do que comparar com outras fontes doadoras, como CTMs de tecido adiposo [48]. A diferenciação das CTMs em osteoblastos foi avaliada através da expressão gênica no 7 dia, através do PCR em tempo real. Os genes avaliados (Runx2, SP7, ALP, BSP, OC e OPN) apresentaram um comportamento diferente nos grupos de CTMs-MO (SHAM, OVX e SENIL), porém a comparação entre os grupos testes de superfícies (CONTROLE, AC e PEO) em cada grupo celular (SHAM, OVX e SENIL) não apresentaram diferenças

estatísticas significantes, mostrando que a superfície do Ti é favorável para a atração de células da linhagem ostoblástica, como já consagrado na literatura.

A expressão de Runx2 e SP7, fatores iniciais essenciais para que ocorra a formação de osteoblastos, foram presentes nos grupos AC e PEO nos grupos SHAM e OVX, não sendo muito expressiva no grupo SENIL. Como marcador da diferenciação de CTMs-MO em Osteoblastos, a ALP foi expressa nos grupos AC e PEO nos grupos SHAM e OVX, tendo uma leve diminuição no grupo SENIL. Os genes BSP, OC e OPN, característicos de uma "etapa final" responsáveis pelo início da mineralização apresentou em uma visão geral dos grupos SHAM, OVX e SENIL, melhores resultados nos grupos AC e PEO. Através dessas análises do PCR e com os dados obtidos pela imunofluorecência, houve uma leve tendência de melhores respostas nas CTMs-MO SHAM para o grupo AC, melhores respostas nas CTMs-MO OVX para o grupo PEO, e no grupo SENIL, características semelhantes dos grupos AC e PEO.

Conforme o processo de diferenciação celular e a mineralização avançam, ocorre um aumento na Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP), assim como encontrado nos resultados realizados no 10º dia, em ambos os grupos celulares pela superfície PEO, seguida pela superfície AC.

As formações de nódulos de mineralização são consideradas como indicadores finais da diferenciação osteogênica "*in vitro*" e sua quantificação demonstra a atividade metabólica das células diferenciadas no processo da osteogênese [65, 66]. Em nosso estudo a superfície PEO apresentou maior formação de nódulos de mineralização aos 21 dias, em todos os grupos celulares (SHAM, OVX e SENIL), resultados similares encontrados na literatura. O estudo de Kazek-Kesik (2015), demonstra que essa atividade de produção de colágeno e mineralização das células, são facilitadas devido as características da superfície promovidas pelo PEO [19, 67].

Os parâmetros obtidos pela histologia na avaliação *in vivo*, demonstrou que houve uma melhor formação e maturação do tecido ósseo na superfície PEO, ao comparar com a superfície AC nos grupos experimentais SHAM e OVX, enquanto no grupo SENIL, houve um comportamento similar na formação e maturação do tecido ósseo nas superfícies (AC e PEO).

Ao complementar com os resultados obtidos pela análise imunoistoquímica, nos demostram que há um equilíbrio ao comparar todos os grupos e superfícies, referente ao processo de reabsorção óssea avaliado através da TRAP. O dinamismo da remodelação óssea avaliado pela OPG e RANKL, assim como a mineralização (OC) ocorre uma

diminuição no grupo OVX, mesmo não sendo estatisticamente significativo, há uma resposta pouco melhor na superfície PEO ao comparar com superfície AC neste grupo. A remodelação (OPG e RANKL) nos grupos SHAM e SENIL ocorrem com uma similaridade nos tratamentos de superfícies, assim como no processo de mineralização (OC).

No estudo de He *et al*. (2017), a avaliação de implantes de titânio comercialmente puro tratados com PEO ao comparar com implantes sem o tratamento, demonstraram nas análises microtomograficas e histométricas, que os implantes com superfícies modificadas demonstram uma melhor bioatividade em comparação com superfícies de titânio puro, porém os autores relatam que a metodologia aplicada, embora com bons resultados na correlação da microtomografia e histometia, há necessidade de estudos complementares histológicos e de biomecânica [68].

Em nosso estudo, as análises dos tecidos calcificados corroboram com os resultados encontrados na histologia. A quantificação através da porcentagem do volume ósseo (Bv.Tv) e a porosidade total (Po(tot)) não apresentou diferenças estatísticas nos tratamentos de superfícies intragrupos experimentais. Porém, no modelo experimental OVX, a superfície AC apresentou uma menor porcentagem de volume ósseo e maior porosidade ao comparar com a superfície PEO, o que não ocorreu nos outros grupos experimentais (SHAM e SENIL). Em relação a qualidade óssea, característica das trabéculas (Tb.Th/ Tb.Sp /Tb.N) foram semelhantes em todos os grupos.

Assim como na análise microtomográfica, a análise biomecânica através do torque reverso, mostrou maiores torque de remoção dos implantes com a superfície PEO em todos os grupos (SENIL >SHAM >OVX) e menores torques na superfície AC, sendo o grupo OVX o menor (SENIL >SHAM >OVX).

Os tratamentos de superfícies testados nesse estudo demonstram que possuem uma grande capacidade de promoção da formação óssea independente dos tipos ósseos experimentais (SHAM, OVX e SENIL), tanto na área de contato osso e implante (ELCOI), quanto para a área de osso neoformado (AON) entre as espiras do implante.

A incorporação de Ca e P no tratamento de superfície, assim como outros biomateriais como o Zinco (Zn) através do PEO, demonstrou no estudo de He *et al*. (2018) que o tratamento de superfície com Ca, P ou Zn podem acelerar a formação e a remodelação óssea, encurtando o período de osseointegração com melhor força de ligação osso implante [69].

Em nosso estudo, a dinâmica do tecido ósseo representada pelo *turnover* ósseo, observado através dos fluorocromos mostrou-se similares nos grupos experimentais. Uma maior prevalência de fluorescência vermelha (alizarina) representa uma maior é a formação de osso novo, aparentemente houve uma maior presença de Alizarina no grupo SENIL PEO, porém sem apresentar significância estatística. A interação dos fluorocromos Calceína vs Alizarina apresentou-se estatisticamente significante no grupo SHAM, sendo representado por maior concentração de Calceína, o qual representa o osso mais velho.

O tratamento de superfície PEO apresentou uma tendência melhor na taxa de aposição mineral (MAR) nos grupos SHAM e SENIL ao comparar com a superfície AC. Para o grupo OVX o tratamento AC demonstrou uma tendência maior que o PEO, porém em ambos os grupos não foi encontrado uma diferença estatística significante.

Estudos vem demonstrando que o tratamento de superfície pelo método PEO favorece a adição de partículas de Mg, Al, Ti, Ca e P, apresentando melhoria na proteção quanto à corrosão e ao desgaste, sendo que a resposta celular inicial é maior com o Ca e P, em relação aos demais, devido uma maior efetividade para a biocompatibilidade e bioatividade [70]. Segundo Zaporozhets (2017), a incorporação desses elementos possui uma capacidade de controlar melhor a resposta inflamatória local pela modificação do processo de ativação leucocitária do sangue, mais evidente nos neutrófilos em contato com a superfície da liga de Ti [71].

Os íons Zn exercem numerosos efeitos positivos sobre o metabolismo dos ácidos nucléicos, síntese proteica e formação óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de fornecer propriedades mecânicas superiores e melhor propriedade de corrosão de materiais, incorporação de íons de Zn juntamente com Ca e P no tratamento por PEO, ainda em estudo *in* vitro demonstra alterações no potencial de corrosão e alterações em tamanho dos poros, à medida que a concentração de Zn aumenta, diminui a concentração de Ca e P [18].

A eleição dos grupos experimentais SHAM, OVX e SENIL, nos demonstrou que para a avaliação do biomaterial testado (AC ou PEO), o modelo osteoporótico promovido pelo grupo OVX, apresenta-se como um melhor modelo. Os dados obtidos pelo método ELISA, na avaliação de estrógeno demonstraram que para as ratas SENIS, há uma diminuição em relação as ratas SHAM, porém em níveis bem superiores as ratas OVX, os quais repercutiram nos processos reparacionais. O modelo OVX foi caracterizado pela

perda de massa óssea, com maior atividade osteoclastogênica em relação a osteoblastogênese, com resultados reparacionais mais críticos, o que permite melhor avaliação dos biomateriais e modificações topográficas como propostas neste estudo.

É importante salientar que o estudo da bioatividade de implantes no tecido ósseo de baixa qualidade, como realizado nesta investigação, não está relacionado ao tratamento da osteoporose, por meio de medicações que revertam a osteoporose, tais como os antirreabsortivos e os seletivos dos receptores de estrógeno. Estudos prévios [72, 73], demonstraram que o tratamento sistêmico, auxiliou nas respostas moleculares da biologia do tecido ósseo. Desta forma, o PEO demonstrou que mesmo em situações bastante críticas do metabolismo ósseo (OVX), foi capaz de reunir características reparacionais favoráveis à osseointegração.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

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

Referências

7. REFERÊNCIAS

[1] T. Albrektsson, A. Wennerberg, Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them, Int J Prosthodont 17(5) (2004) 536-543.
[2] L.P. Faverani, V.A. Barao, M.F. Pires, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, W.G. Assuncao, Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions, Materials science & engineering. C, Materials for biological applications 43 (2014) 1-10.
[3] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, Journal of dental research 83(7) (2004) 529-33.
[4] C.J. Ivanoff, C. Hallgren, G. Widmark, L. Sennerby, A. Wennerberg, Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans, Clinical oral implants research 12(2) (2001) 128-34.
[5] M.G. Tavares, P.T. de Oliveira, A. Nanci, A.C. Hawthorne, A.L. Rosa, S.P. Xavier, Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H2SO4/H2O2 enhances contact osteogenesis, Clinical oral implants research 18(4) (2007) 452-8.
[6] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, Clinical oral implants research 20 Suppl 4 (2009) 172-84.
[7] S.P. Xavier, P.S. Carvalho, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments, Journal of dentistry 31(3) (2003) 173-80.
[8] A. Lin, C.J. Wang, J. Kelly, P. Gubbi, I. Nishimura, The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo, The International journal of oral & maxillofacial implants 24(5) (2009) 808-16.
[9] A. Gupta, M. Dhanraj, G. Sivagami, Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview, Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research 21(3) (2010) 433-8.
[10] P. Trisi, R. Lazzara, A. Rebaudi, W. Rao, T. Testori, S.S. Porter, Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla, Journal of periodontology 74(7) (2003) 945-56.
[11] N.T. Oliveira, F.P. Guastaldi, V. Perrotti, E. Hochuli-Vieira, A.C. Guastaldi, A. Piattelli, G. Iezzi, Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits, Clinical implant dentistry and related research 15(3) (2013) 427-37.
[12] T.P. Queiroz, F.A. Souza, A.C. Guastaldi, R. Margonar, I.R. Garcia, E. Hochuli-Vieira, Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits, Clinical oral implants research 24(8) (2013) 896-903.
[13] W. Zechner, S. Tangl, G. Furst, G. Tepper, U. Thams, G. Mailath, G. Watzek, Osseous healing characteristics of three different implant types - A histologic and histomorphometric study in mini-pigs, Clinical oral implants research 14(2) (2003) 150-157.
[14] F.A. Souza, T.P. Queiroz, A.C. Guastaldi, R. Garcia, O. Magro, R.S. Nishioka, K.E. Sisti, C.K. Sonoda, Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[51] E. Hamade, G. Azzar, J. Radisson, R. Buchet, B. Roux, Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro: Influence of Ca2+ and nature of substrates, European journal of biochemistry 270(9) (2003) 2082-2090.
[52] P.J. Marie, Transcription factors controlling osteoblastogenesis, Archives of Biochemistry and Biophysics 473(2) (2008) 98-105.
[53] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrugghe, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, Cell 108(1) (2002) 17-29.
[54] L. Yang, P. Cheng, C. Chen, H.B. He, G.Q. Xie, H.D. Zhou, H. Xie, X.P. Wu, X.H. Luo, miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization, J Bone Miner Res 27(7) (2012) 1598-606.
[55] P.T. de Oliveira, A. Nanci, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, Biomaterials 25(3) (2004) 403-13.
[56] P.T. de Oliveira, S.F. Zalzal, M.M. Beloti, A.L. Rosa, A. Nanci, Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography, Journal of biomedical materials research. Part A 80(3) (2007) 554-64.
[57] D. Krupa, J. Baszkiewicz, J. Zdunek, J.W. Sobczak, W. Lisowski, J. Smolik, Z. Slomka, Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium, Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials 100(8) (2012) 2156-66.
[58] W.F. Pedrosa, Jr., R. Okamoto, P.E. Faria, M.F. Arnez, S.P. Xavier, L.A. Salata, Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone, Clinical oral implants research 20(11) (2009) 1254-64.
[59] N. Manrique, C.C. Pereira, E.R. Luvizuto, P. Sanchez Mdel, T. Okamoto, R. Okamoto, D.H. Sumida, C. Antoniali, Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats, Clin Oral Investig 19(6) (2015) 1319-27.
[60] L.P. Faverani, T.O.B. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A.C. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, Clinical Oral Investigations (2017).
[61] E.S. Ogawa, A.O. Matos, T. Beline, I.S. Marques, C. Sukotjo, M.T. Mathew, E.C. Rangel, N.C. Cruz, M.F. Mesquita, R.X. Consani, V.A. Barao, Surface-treated commercially pure titanium for biomedical applications: Electrochemical, structural, mechanical and chemical characterizations, Materials science & engineering. C, Materials for biological applications 65 (2016) 251-61.
[62] I. Marques, M.F. Alfaro, N.C.D. Cruz, M.F. Mesquita, C. Takoudis, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms, J Mech Behav Biomed Mater 60 (2016) 8-21.
[63] A.O. Matos, A.P. Ricomini-Filho, T. Beline, E.S. Ogawa, B.E. Costa-Oliveira, A.B. de Almeida, F.H. Nociti Junior, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface, Colloids Surf B Biointerfaces 152 (2017) 354-366.
[64] J.M. Cordeiro, T. Beline, A.L.R. Ribeiro, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, R. Landers, L.P. Faverani, L.G. Vaz, L.M.G. Fais, F.B. Vicente, C.R. Grandini, M.T. Mathew, C. Sukotjo, V.A.R. Barao, Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants, Dent Mater 33(11) (2017) 1244-1257.

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

8. ANEXOS

Anexo A – Aprovação do comitê de ética

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Unesp Araçatuba

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"A influência da texturização de superfície do Titânio comercialmente puro (Ticp) com incorporação de Ca e P produzida pela oxidação por plasma eletrolítico em ossos de baixa intensidade: Um estudo in vitro, ex-in vivo e in vivo"**, Processo FOA nº 01040-2016, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Dezembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2019.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"The influence of commercially pure Titanium (cpTi) coating with Ca and P incorporation produced by plasma electrolytic oxidation on low density bone: An in vitro, ex-in vivo and in vivo study"**, Protocol FOA nº 01040-2016, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 14, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 01, 2019.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2020.

Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

Anexo B –Biomaterials

Link para as normas de publicação:

https://www.journals.elsevier.com/biomaterials