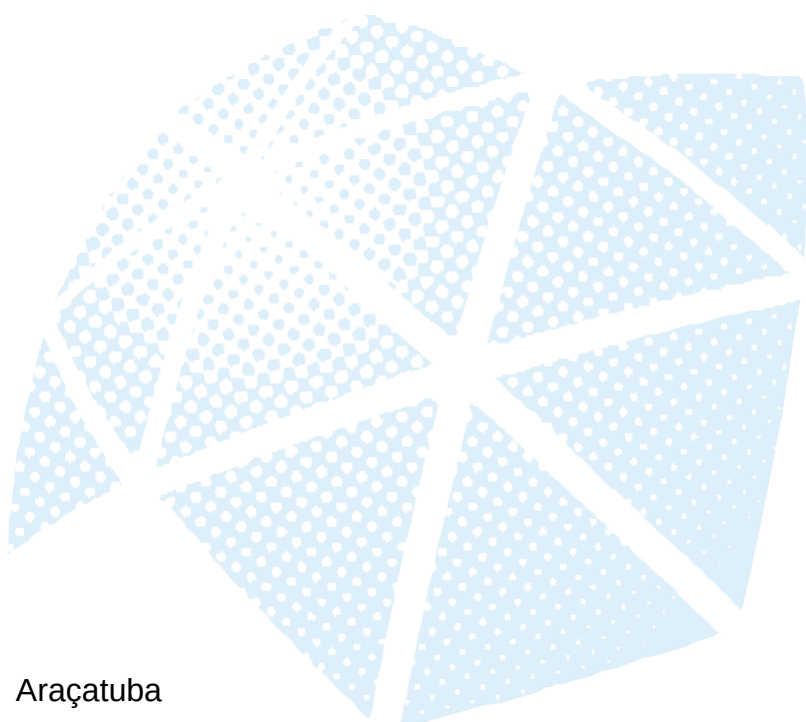




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**Estudo da resposta óssea de uma superfície de implante
revestida com odanacatib através das análises de
molhabilidade, topografia, microtomografia
computadorizada, histológica e histométrica**



Araçatuba
2023

NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**Estudo da resposta óssea de uma superfície de implante
revestida com odanacatib através das análises de
molhabilidade, topografia, microtomografia
computadorizada, histológica e histométrica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Profº. Associado Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba
2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S211e Sanches, Natália dos Santos.
Estudo da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com odanacatib através das análises de molhabilidade, topografia, microtomografia computadorizada, histológica e histométrica/Natália dos Santos Sanches. – Araçatuba, 2023
55 f. : il. ; graf.

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

1. Osseointegração 2. Titânio 3. Catepsina K I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho a minha avó Terezinha de Sousa Santos.

Seu auxílio em minha criação foi imprescindível para que meus pais pudessem alcançar suas conquistas profissionais e nos proporcionar uma vida melhor. Tive a honra de ter a sua presença em todas as fases da minha vida, desde as primeiras palavras até a minha formatura na faculdade.

Ela sempre me dizia: “Que anjo da guarda te acompanhe” e só agora consigo entender que ela sempre foi o meu anjo da guarda, minha estrelinha que passou a brilhar ao lado do Tiago.

Agradeço a Deus por me proporcionar uma vida ao seu lado, o meu amor é sincero e as lembranças eternas.

Você sempre estará em meu coração... Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me permitiu trilhar esta jornada até aqui com pessoas maravilhosas ao meu lado. Agradeço por me acompanhar e guiar minhas decisões, e acima de tudo por me capacitar e trazer essa vitória para a minha vida. Tenho certeza que ao seu lado irei muito mais longe!

Aos meus pais **Janaina de Sousa Santos Sanches e Edson Roberto Sanches**, que estão sempre ao meu lado, me auxiliando para que eu possa ser independente, disciplinada e educada. Cada decisão tomada requer sacrifícios, mas o suporte dado por vocês me incentiva a sempre pensar positivo e grande. Obrigada por confiarem em mim e mesmo distante fisicamente sempre mostrando-se presentes e dispostos a tudo por mim e por nossa família. Vocês são o meu maior exemplo e quero sempre honrá-los. Eu amo vocês!

Ao meu namorado **Guilherme Alexandre Silva Prado**, que mesmo com a distância sempre se mostrou presente, pois nossos planos sempre foram concretos. Obrigada por me fortalecer em momentos difíceis, por abrir meus olhos quando estou enlouquecendo com os meus afazeres e por sempre comemorar minhas pequenas vitórias. Você aceitou sacrificar muitas coisas pelo nosso relacionamento, mas com uma certeza, que todos os sacrifícios são passageiros e que são em prol do nosso futuro. Eu te amo!

A minha melhor amiga **Vitória Zinza Custódio**, só tenho a agradecer por estar ao meu lado me aconselhando e torcendo por mim, acho plausível dizer que você sabe lidar com o meu jeito teimoso de ser e que sem o seu apoio eu não teria conquistado metade. O tanto que você me ouviu e incentivou não está escrito. Você me tornou uma pessoa melhor. Sua amizade é muito importante para mim e saiba que sempre estarei aqui para você. Obrigada por ser “a minha pessoa”. Te amo!

As minhas amigas **Alana Semenzin Rodrigues e Alessandra Froes de Oliveira**, que nestes 7 anos de amizade e morando juntas, aprendemos muito umas com as outras e tenho certeza que carregamos um pouquinho de cada uma em nossa rotina. Vocês são muito especiais para mim e irei levá-las para sempre em meu coração. Eu amo muito vocês. Sempre estarei aqui torcendo por vocês.

A minha segunda família: **Rita, Wellington, Arthur, Leuci e Marco**, agradeço por todo zelo, suporte e incentivo para que eu conquiste meus sonhos. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos, por cada risada, abraço e palavra de motivação. Sei que em vocês eu tenho um porto seguro. Amo vocês!

A minha equipe de pesquisa: **Carol, Lara, Maria, Estefany e Sara**, sou grata por toda a dedicação de vocês com os projetos e principalmente pela amizade. Ter vocês comigo no mestrado foi uma das melhores coisas que poderia ter me acontecido. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, nos surtos e nas alegrias. Suas conquistas são as minhas conquistas. Amo vocês!

As minhas amigas **Izabella Sol e Maisa** que desde o primeiro ano do mestrado me acolheram e me ensinaram muito sobre cirurgia e sobre a vida. Obrigada por sempre se importarem comigo, sem vocês eu não estaria aqui hoje. Amo vocês!

Aos **Pós-graduandos e Professores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

Ao meu orientador **Prof.º Associado Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, por todo ensinamento, aperfeiçoamento e credibilidade. Todo o conhecimento adquirido e projetos concluídos foram um incentivo para eu querer dar continuidade aos estudos, sempre buscando independência e didática. Agradeço de coração por todas as oportunidades ao longo do período de graduação e pós-graduação. Foi uma grande honra trabalhar ao seu lado e representar a nossa universidade em seu nome.

A **Prof.^a Associada Dra. Roberta Okamoto**, uma profissional inspiradora e encantadora, que sempre se mostrou disposta a dar seu melhor para ver o nosso sucesso. Obrigada por todo sorriso de encorajamento e por me mostrar que inteligência e bom humor podem ser aliados. A senhora é uma pesquisadora admirável.

Ao **Dr. Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira**, um profissional admirável e de grande coração. Obrigada por todo acolhimento, encorajamento e acima de

tudo pelas oportunidades. Sua confiança em mim me incentivou a batalhar por minhas conquistas. Ter vestido a camisa da IM-PRÓ foi uma honra. Te desejo todo o sucesso do mundo.

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** e ao **ex-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Profº Titular Wilson Roberto Poi**, por todas as conversas de encorajamento. Obrigada por sempre manter a fé, em nós alunos. Sei que o futuro reserva grandes coisas para todos nós. Agradeço também ao atual diretor **Profº Titular Glauco Issamu Miyahara** e ao **Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem** por sempre se mostrarem presentes aos alunos, incentivando-os a sempre buscar mais.

Aos assistentes de Suporte Acadêmico **Marco e Paulo**, pelo apoio técnico que forneceram durante o período de desenvolvimento das etapas laboratoriais. Ao seu **João** que sempre nos recebeu de braços abertos. Ao **Fausto** e ao **Renato** que sempre me receberam bem e tentavam me animar de todas as formas.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica Processo 2021/08067-3, a qual foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Sanches NS. **Estudo da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com odanacatib através das análises de molhabilidade, topografia, microtomografia computadorizada, histológica e histométrica.** 2023 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Atualmente novos princípios ativos de função antirreabsortiva têm ganhado campo de estudo para avaliar seus mecanismos e comportamento biológico. Com isso, um dos maiores desafios é impregnar estes princípios na superfície do implante de titânio e estimular a neoformação óssea e diminuir a ação reabsortiva a longo prazo. O objetivo foi avaliar a dinâmica da resposta óssea de uma superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), por duplo ataque ácido e solução de fluido corpóreo (GX) e pelo princípio ativo Odanacatib (GO) na concentração de 0,26mg/ml através do método biomimético em modelo padronizado em tibia de rato. Foram designados 48 ratos machos (Wistar), 24 discos e 102 implantes de titânio, sendo igualmente subdivididos entre os grupos para a realização das análises de molhabilidade, topográfica, microtomografia computadorizada, histológica, histométrica. Na microscopia eletrônica de varredura todos os grupos apresentaram uma superfície homogeneamente rugosa e irregular, com deposição de hidroxiapatita nos GX e no GO. Na energia dispersiva de raios X o GC apresentou Ti puro, o GX apresentou Ti, O, Na, P, Ca e Cl, e o GO Ti, O, Si, P, Cl e Ca. Na análise de ângulo de contato o GX e GO apresentaram uma superfície hidrofílica para ambas as soluções testadas, água destilada e SFC, e GC apresentou perfil hidrofílico na solução de água destilada e no SFC hidrofóbico. Na análise histológica foi possível observar um comportamento semelhante entre os grupos no quesito de neoformação óssea e corticalização na área de interface osso/implante. Para a avaliação dos dados quantitativos foi realizado o ANOVA 2 fatores, com pós teste Tukey adotando o nível de significância ($p < 0.05$). Na molhabilidade houve diferença estatística entre o GC e o GO para a solução de água destilada ($p = 0,0007$), e para SFC entre os grupos GC e GX ($p = 0,0145$) e GC e GO ($p = 0,0007$). Nos parâmetros microtomográficos obteve-se diferença estatística significativa para Tb.sp aos 15 dias entre os grupos GC e GX ($p = 0,0043$) e aos 40 dias entre os grupos GC e GO ($p = 0,0314$), e para o Conn.Dn. aos 15 dias entre os grupos GC com GO ($p = 0,0008$) e GX com GO ($p < 0,0001$), aos 40 dias para GC com

GX ($p=0,236$) e GX com GO ($p=0,227$), e na comparação intragrupos entre o GO 15 dias com GO 40 dias ($p=0,0227$). No histométrico para AON houve diferença estatística significativa na comparação intergrupos no período de 15 dias para o GC com o GO ($p=0,035$) e para o GX com o GO ($p=0,0347$), e intragrupos, entre os períodos de 15 dias e 40 dias para o GC ($p<0,0001$), para o GX ($p=0,0001$) e GO ($p<0,0001$). Para os valores de ELCOI obteve diferença estatística significativa na comparação intragrupos entre os períodos de 15 e 40 dias para o GC ($p=0,0089$) e para o GO ($p=0,005$). As modificações de superfície propostas se mostraram eficazes para osseointegração de implantes em organismos normofisiológicos, evidenciando o efeito tópico da deposição do Odanacatib pelo método biomimético, ao apresentar um aumento substancial da formação óssea e corticalização de superfície dos 15 aos 40 dias.

Palavras-chave: Osseointegração. Titânio. Catepsina K.

Sanches NS. **Study of the bone response of an implant surface coated with odanacatib through the analysis of wettability, topography, computed microtomography, histological and histometric.** 2023 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Currently, new active principles of anti-absorptive function have gained the field of study to evaluate their mechanisms and biological behavior. Thus, one of the most significant challenges is to impregnate these principles on the surface of the titanium implant and stimulate new bone formation and decrease the long-term reoperation action. The objective was to evaluate the dynamics of the bone response of a surface modified by the double acid attack (GC), double acid attack and body fluid solution (GX), and the active ingredient Odanacatib (GO) at a concentration of 0,26mg/ml using the biomimetic method in a standardized model in rat tibia. 48 male rats (Wistar), 24 discs, and 102 titanium implants were designated and subdivided between the groups for the analysis of wettability, topography, computed microtomography, histological, and histometric. In scanning electron microscopy all groups showed a homogeneously rough and irregular surface, with hydroxyapatite deposition in GX and GO. In the energy dispersive X-ray spectroscopy the GC presented pure Ti, the GX presented Ti, O, Na, P, Ca, and Cl, and the GO Ti, O, Si, P, Cl, and Ca. In the contact angle analysis, the GX and GO presented a hydrophilic surface for both tested solutions, distilled water and GC showed a hydrophilic profile in the distilled water solution and the hydrophobic SFC. In the histological analysis, it was possible to observe a similar behavior between the groups in the bone neoformation and corticalization in the bone/implant interface area. For the evaluation of quantitative data was performed ANOVA 2 factors, with the post-Tukey test adopting the significance level ($p < 0.05$). Wettability was statistically different between GC and GO for the distilled water solution ($p=0.0007$), and for SFC between GC and GX ($p=0.0145$) and GC and GO ($p=0.0007$). In the microtomographic parameters, a statistically significant difference was obtained for Tb.sp at 15 days between the GC and GX groups ($p=0.0043$) and at 40 days between the GC and GO groups ($p=0.0314$), and for Conn.Dn. at 15 days between the GC groups with GO ($p=0.0008$) and X with GO ($p<0,001$) at 40 days for CG with GX ($p=0.236$) and GX with GO ($p=0.227$), and in intragroup comparison

between GO 15 days with GO 40 days ($p=0.0227$). In the histometric for NBA, there was a significant statistical difference in the intergroup comparison in the period of 15 days for GC with GO ($p=0.035$) and for GX with GO ($p=0.0347$), and intragroup between the periods of 15 days and 40 days for GC ($p=0.0001$), for GX ($p=0.0001$) ($p<0.0001$). For the values of ELCOI obtained significant statistical differences in the intragroup comparison between the periods of 15 and 40 days for the GC ($p=0.0089$) and for the GO ($p = 0.005$). The surface modifications were effective for the osseointegration of implants in normophysiologic organisms, evidencing the topical effect of deposition of Odanacatib by the biomimetic method when presenting a substantial increase in bone formation and surface corticalization from 15 to 40 days.

.

Keywords: Osseointegration. Titanium. Cathepsin K.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - 1ª Fase de modificação por ácido dos GC, GX e GO.....	21
Figura 2 - Implantes imersos na solução de NaOH	22
Figura 3 - Preparação do simulador de fluído corpóreo.....	22
Figura 4 - Solução de fluído corpóreo com Odanacatib.....	23
Figura 5 - Implantes e discos imersos em SFC e SFC com Odanacatib	23
Figura 6 - Banho dos implantes na etapa final do tratamento de superfície dos GX e GO.....	24
Figura 7 - Delineamento experimental referente análise óssea.....	25
Figura 8 - Procedimento cirúrgico: instalação dos implantes.....	28
Figura 9 - Análise de molhabilidade para obtenção do ângulo de contato.....	29
Figura 10 - Seleção da área de interesse do implante em vista longitudinal, para avaliação em 3D da osseointegração.....	30
Figura 11 - Seleção da área de interesse do implante em vista sagital, para avaliação em 3D da osseointegração, mostrando o ROI escolhido.....	31
Figura 12 - Sequência da seleção da área de interesse do implante por meio do uso do programa ImageJ.....	32
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais dos grupos: GC, GX e GO.....	34
Figura 14 - Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GC	35
Figura 15 - Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GX	35
Figura 16 - Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GO	35
Figura 17 - Obtenção do ângulo de contato	36
Figura 18 - Análise histológica dos grupos experimentais aos 15 dias.....	41
Figura 19 - Análise histológica dos grupos experimentais aos 40 dias.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise de molhabilidade	37
Gráfico 2 - Parâmetro BV/TV.....	38
Gráfico 3 - Parâmetro Tb.Th.....	38
Gráfico 4 - Parâmetro Tb.N	39
Gráfico 5 - Parâmetro Tb.sp	39
Gráfico 6 - Parâmetro Conn.Dn.....	40
Gráfico 7 - Análise histométrica para os valores de área óssea neoformada (AON)	43
Gráfico 8 - Análise histométrica para os valores de extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise estatística da avaliação do ângulo de contato	37
Tabela 2 - Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.sp	40
Tabela 3 - Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Conn.Dn	40
Tabela 4 - Análise histométrica para os valores de área óssea neoformada (AON)	43
Tabela 5 - Análise histométrica para os valores de extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI)	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetro BV/TV	38
Quadro 2 - Parâmetro Td.Th	38
Quadro 3 - Parâmetro Tb.N.....	39
Quadro 4 - Parâmetro Tb.sp.....	39
Quadro 5 - Parâmetro Conn.Dn	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AON	Área de tecido ósseo neoformado
Au	Ouro
BSAP	Fosfatase alcalina específica do osso
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaP	Fosfato de Cálcio
Catkl	Protease de cisteína lisossomal catepsina K
Cl	Cloro
Cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Conn.Dn	Densidade de conectividade
Ctan	Ctanalyser
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
ELCOI	Extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante
ESL	Esclerodermia localizada
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GC	Grupo Controle
GO	Grupo modificado por Odanacaib
GX	Grupo modificado por SFC
HE	Hematoxilina e eosina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg/Kg	Miligrama por quilo
Mg/kg/dia	Miligrama kilo dia
Mg/L	Miligrama por Litro
Micro-ct	Microtomografia computadorizada
ml	Mililitros
ml/Kg	Mililitro por quilo
Mm	Milímetro

Mol.L-1	Mol Litro
N	Nitrogênio
N.cm	Newton por centímetro
Na	Sódio
NAOH	Hidróxido de Sódio
O	Oxigênio
°c	Graus célsius
OVX	Ovariectomizada
p	Nível de significância
P	Fósforo
ph	Potencial hidrogeniônico
ROI	Área ao redor do implante
SFC	Solução de Fluido Corpóreo
SHAM	Grupo controle isento de tratamento e alteração sistêmica
Si	Silício
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
Ti	Titânio
TRAP-5b	Tratarato 5b
%	Porcentagem
μl	Microlitros
μm	Micrometro
θ	Ângulo de contato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Tratamento dos Implantes e Discos.....	21
3.1.1 Preparação da Superfície Teste e Controle	21
3.2 Delineamento Experimental	24
3.3 Procedimento Cirúrgico.....	26
3.4 Coleta Das Amostras	28
3.5 Análises Propostas	29
3.5.1 Análise de topográfica	29
3.5.2 Análise de molhabilidade	29
3.5.3 Microtomografia computadorizada.....	30
3.5.4 Análise histológica e histométrica	31
3.6 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Análise Topográfica	34
4.2 Análise De Molhabilidade.....	36
4.3 Análise de Microtomografia Computadorizada.....	37
4.4 Análise Histológica e Histométrica	41
4.4.1 Análise histológica	41
4.4.1 Área óssea neoformada (AON).....	42
4.4.2 Extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI).....	44
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO	55
Anexo A – Comitê de Ética no Uso Animal	55

1 INTRODUÇÃO

O mercado odontológico dispõe de diferentes tecnologias visando otimizar o processo da osseointegração de implantes dentários por meio da modificação da geometria, da composição química e da rugosidade da superfície. Estudos mostram que as superfícies porosas favorecem a resposta biológica, podendo-se observar aumento da área de contato osso-implante, da estabilidade primária e da resistência ao torque de remoção (; YOUNIS *et al.*, 2010 e MAZZO *et al.*, 2012).

A osseointegração é uma resposta biológica que se inicia com a angiogênese e osteocondução das células osteogênicas, que em contato com a superfície do implante se diferenciam em osteoblastos e secretam matriz óssea até que o processo de osteogênese atinja seu platô. A restauração da homeostasia se dá pela remodelação óssea, alcançando o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea intrinsecamente. Durante este processo, os osteoclastos possuem papel fundamental, pois secretam a protease cisteína lisossomal cathepsina K (CatKI) para degradação das proteínas da matriz óssea e ácidos para desmineralização da hidroxiapatita, permitindo que haja união funcional entre o tecido ósseo e a superfície do implante a longo prazo (PENNYPACKER *et al.*, 2011; CUSICK *et al.*, 2012; e MENDES; DAVIES, 2016).

Na literatura, um dos principais objetivos dos estudos de tratamento de superfície, além da modificação morfológica, é a incorporação química de princípios ativos com propriedades bioativas, ostecondutoras e até mesmo osteoindutoras, que otimizem e estimulem a osteogênese, além de inibir a reabsorção óssea a longo prazo (CHAPURLAT *et al.*, 2007; STEPAN *et al.*, 2007).

Dentre os diferentes métodos de incorporação de compostos dispostos na literatura, o tratamento biomimético para recobrimento da superfície do implante com solução de fluidos corpóreos (SFC) proporciona a liberação de fatores osteogênicos no sítio de implantação, atuando como substância carreadora (drug delivery). Estudos também demonstram sua eficácia quando associado ao fosfato de cálcio e medicamentos antirreabsortivos (QUEIROZ *et al.*, 2013 e SANCHES, 2020)

Dentre os medicamentos antirreabsortivos estudados cabe-se introduzir o Odanacatib (MK-0822), um inibidor altamente seletivo e sensível de CatKI, que está em fase de avaliação pré-clínica e tem apresentado propriedades que podem torná-lo vantajoso em relação a outros agentes disponíveis na indústria farmacêutica. Ao

contrário dos bifosfonatos, o Odanacatib reduz a eficiência de reabsorção das células osteoclásticas sem alterar sua diferenciação, migração e polarização (DUONG, 2012; MUISE *et al.*, 2016). Visto que seu mecanismo de ação se resume à inibição direta da CatKI que degradam proteínas em múltiplos tecidos, inibindo no tecido ósseo o processo de reabsorção (LEUNG *et al.*, 2011 e BOONEN *et al.*, 2012).

Por não ocorrer a apoptose dos osteoclastos, onde os sinais entre as células osteogênicas podem continuar de forma inalterada, tem-se que o efeito reproduzido pelos inibidores de CatKI é substancial na formação óssea e na inibição da reabsorção, por atuar de forma exclusiva nos osteoclastos. Corroborando com o estudo realizado em camundongos tratados sistemicamente com inibidores de CatKI, reafirmando que há separação entre a ação osteoblástica e osteoclástica, resultando no aumento da formação óssea (LOTINUN *et al.*, 2013), assim como em demais estudos em que houve o aumento da massa óssea trabecular (; SAFTIG *et al.*, 1998 e PENNYPACKER *et al.*, 2009). Em contraste, a superexpressão de cathepsina K em camundongos transgênicos aumentou a reabsorção óssea e resultou em altas taxas de renovação óssea (KIVIRANTA *et al.*, 2001).

Estudos realizados em macacos ovariectomizados, tratados com duas concentrações de inibidores de CatKI, afirmam que os grupos tratados com a maior concentração apresentaram melhores resultados em relação aumento da densidade mineral óssea, suprimindo a reabsorção óssea, não afetando o número de osteoclastos pelos biomarcadores de osteoclastos-fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRAP-5b), de colágeno-1 e fosfatase alcalina específica do osso (BSAP) e melhores resultados histológicos em relação aos grupos estudos (FRATZL-ZELMAN *et al.* 2013). Além de apresentar um aumento significativo na resistência óssea medida pela carga final com tratamento com Odanacatib (CUSICK *et al.*, 2012).

Seguindo as resultantes destas pesquisas apresentadas, cabe-se afirmar que o Odanacatib revelou efeitos positivos em relação a neoformação nos compartimentos ósseos ao reduzir a remodelação óssea nas regiões corticais e medulares, além de conferir aumento na espessura óssea, principalmente, na interface osso/implante (CUSICK *et al.*, 2012). Além disso em estudos em coelhos ovariectomizados, o Odanacatib preveniu a perda óssea, assim como o alendronato, no entanto, o grupo tratado com Odanacatib mostrou menor redução dos

marcadores de formação óssea em comparação ao alendronato (PENNYPACKER *et al.*, 2009; CABAL *et al.*, 2013 e WILLIAMS *et al.*, 2013).

É importante salientar que a CatKI está presente predominantemente em osteoclastos, porém também pode ser encontrada em fibroblastos da pele e células pulmonares (BRÖMME; LECAILLE, 2009). Com isso, efeitos adversos aos inibidores de CatKI também são relatados na literatura. Reações cutâneas semelhantes à morfeia (esclerodermia localizada-EsL), são observadas, na qual o excesso de deposição de colágeno leva ao desenvolvimento de lesões escleróticas, além de preocupações em relação a infecções respiratórias graves observadas em ensaios anteriores com Balicatib (outro inibidor da CatKI). Esses efeitos ainda estão em fase de investigação em ensaios com o Odanacatib e por esta questão sua aprovação regulatória permanece em espera (PERONI *et al.*, 2008; BONE *et al.*, 2010 e RÜNGER *et al.*, 2012).

A literatura carece de estudo de caracterização de superfícies associado ao Odanacatib para mapear suas propriedades topográficas, perfil físico-químico e comportamento biológico no que diz respeito a osseointegração. Visando alternativas reabilitadoras para beneficiar pacientes que apresentem alteração no metabolismo ósseo, como é o exemplo da osteoporose, e em casos em que a quantidade e a qualidade óssea são deficientes (MCCLUNG *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

O estudo atual propôs avaliar a resposta óssea de uma superfície de titânio comercialmente puro modificada por duplo ataque ácido, por SFC e pelo princípio ativo Odanacatib na concentração de 0,26mg/ml (miligrama por mililitro), por meio do método biomimético em modelo padronizado em tíbia de rato macho através das análises de molhabilidade, topografia, microtomografia computadorizada, histológica e histométrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tratamento dos Implantes e Discos

3.1.1 Preparação da Superfície Teste e Controle

1ª Fase: Modificação por ácido:

Nesta fase, a superfície dos 102 implantes e 24 discos de titânio comercialmente puros sofreram uma subtração ácida por meio de banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico, o qual provoca erosões na superfície (Figura 1A, B e C). A concentração dos ácidos, o tempo e a temperatura são fatores determinantes da microestrutura da superfície. Em que, as concentrações e tempo de exposição dos ácidos empregados constituem o segredo de indústria, previamente patenteado.

Os discos foram marcados em sua periferia com auxílio de uma broca diamantada para o controle do tratamento de sua superfície e os implantes foram posicionados de forma que todas as espiras mantivessem o contato com as soluções.

Figura 1 - 1ª Fase de modificação por ácido dos GC, GX e GO



Modificação por subtração ácida em banhos:

- A) Ácido nítrico;
- B) Ácido sulfúrico; e
- C) Ácido clorídrico.

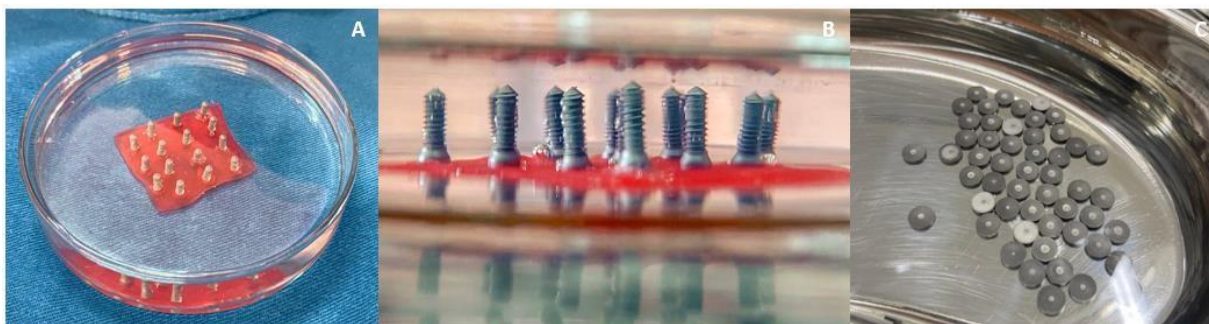
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

2ª Fase: Modificação da superfície pelo método biomimético e deposição de odanacatib pelo mesmo nos implantes e discos testes:

Nesta outra fase, os implantes e os discos de titânio tiveram sua superfície modificada por SFC e Odanacatib segundo o método biomimético de modificação de superfície, que imita o processo biológico de formação de tecido duro em corpo (ABE; KOKUBO; YAMAMURO, 1990; APARECIDA *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2013) em dois ciclos. Os implantes e dos discos foram imersos em 50 mililitros (ml) de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) e 5,0 Mol Litro (Mol.L-1) e colocados em estufa por um período de 24 horas a 60 graus célsius (°C), para a

ativação da superfície (Figura 2A, B). Em que os mesmos foram mantidos, posteriormente, em estufa por um período de 3 horas a 60°C para secagem da superfície.

Figura 2 – Implantes imersos na solução de NaOH

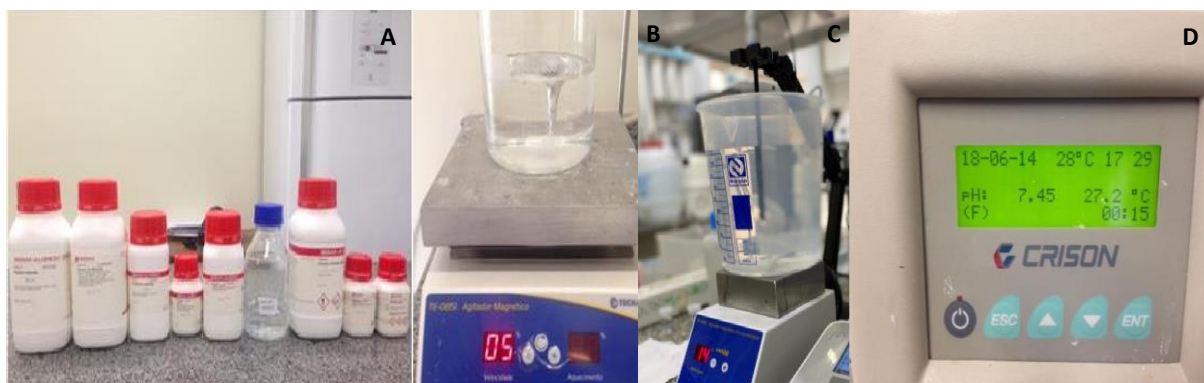


- A) Implantes imobilizados verticalmente imersos pela solução de NaOH; e
B) Vista de perfil dos implantes na solução.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Posteriormente, os implantes e os discos foram imersos em 300 ml de SFC modificada, que simula os fluidos corpóreos por apresentar composição iônica e o potencial hidrogeniônico (pH) semelhantes ao do plasma sanguíneo (Figura 3A, B, C e D). Em seguida o Odanacatib a 0,26mg/ml foi homogeneizado na solução de SFC (Figura 4A, B e C).

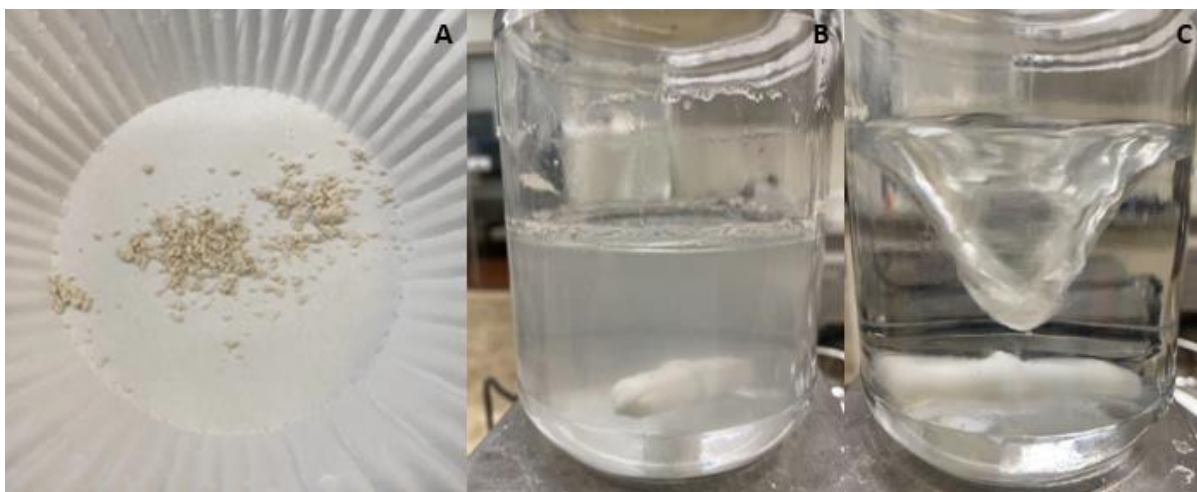
Figura 3 - Preparação do simulador de fluido corpóreo



- A) Elementos químicos utilizados no preparo o SFC;
B) Homogeneização da solução com agitador orbita;
C) Ajuste do pH do SFC, e
D) Alcance do pH desejado

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Figura 4 – Solução de fluido corpóreo com Odanacatib

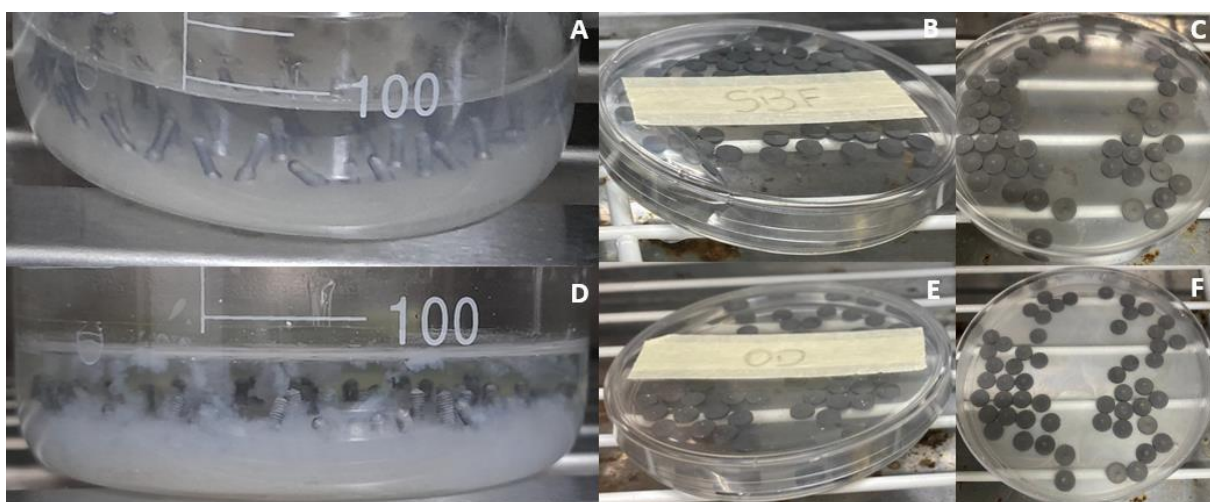


- A) Pesagem do composto Odanacatib na proporção de 0,26mg/L;
 B) Recipiente de vidro em com SFC e Odanacatib a 0,26mg/L; e
 C) Homogeneização da SFC com Odanacatib por meio do agitador orbitário.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Os implantes e os discos permaneceram imersos nas soluções correspondentes a cada grupo por um período de 4 dias com trocas a cada 24 horas, em estufa a 37°C e pH 7.45, para que houvesse o recobrimento pelo SFC e pelo composto Odanacatib (HY-10042-Odanacatib (Synonyms: MK-0822) 5mg-MCE) nas superfícies (Figura 5A e B).

Figura 5 – Implantes e discos imersos em SFC e SFC com Odanacatib



- A) Implantes do GX submersos em SFC;
 B) Discos submersos em SFC em uma placa de petri identificada;
 C) Discos submersos em SFC;
 D) Implantes do GO submersos em SFC com Odanacatib 0,26mg/ml;
 E) Discos submersos em SFC com Odanacatib 0,26mg/ml em uma placa de petri identificada; e
 F) Discos submersos em SFC com Odanacatib 0,26mg/ml.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Após esta fase, os implantes e os discos passaram por banhos em peróxido de hidrogênio volume 10 por 4 horas, com trocas periódicas de hora em hora (Figura 6A, B e C); em solução salina fisiológica 0,9 porcentagem (%) por 10 minutos e lavagem rápida em álcool absoluto. Após os banhos, os implantes foram mantidos em estufa por um período e 3 horas a 60°C para secagem da superfície.

Figura 6 – Banho dos implantes na etapa final do tratamento de superfície dos grupos GX e GO



- A) Vista de perfil dos implantes submersos na solução de Peróxido de Hidrogênio de volume 10;
- B) Vista de perfil dos implantes submersos na solução de Soro Fisiológico à 0,9%;
- C) Vista superior dos implantes submersos na solução de Peróxido de Hidrogênio de volume 10; e
- D) Vista superior dos implantes submersos na solução de Soro fisiológico à 0,9%.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

3.2 Delineamento Experimental

No presente estudo foram utilizados 48 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), com base no cálculo amostral realizado no site http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/ta_diferenca_media_independente.php para as análises referente a neoformação óssea, tendo como trabalho piloto: “Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica, histológica, histométrica, imunoistoquímica e micro-ct”, resultando em 4 animais por período, em que o animal recebe 2 implantes, sendo um instalado em cada uma das tíbias.

O projeto seguiu os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em que foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), que foi protocolado sob n° 0524-2021 (Anexo A).

Com isso, foi realizado o delineamento experimental partindo de duas análises in vitro de topografia e molhabilidade e in vivo a partir da amostra de 48 animais subdividido em 3 grupos experimentais para a realização das análises de microtomografia computadorizada, histológica e histométrica (Figura 7).

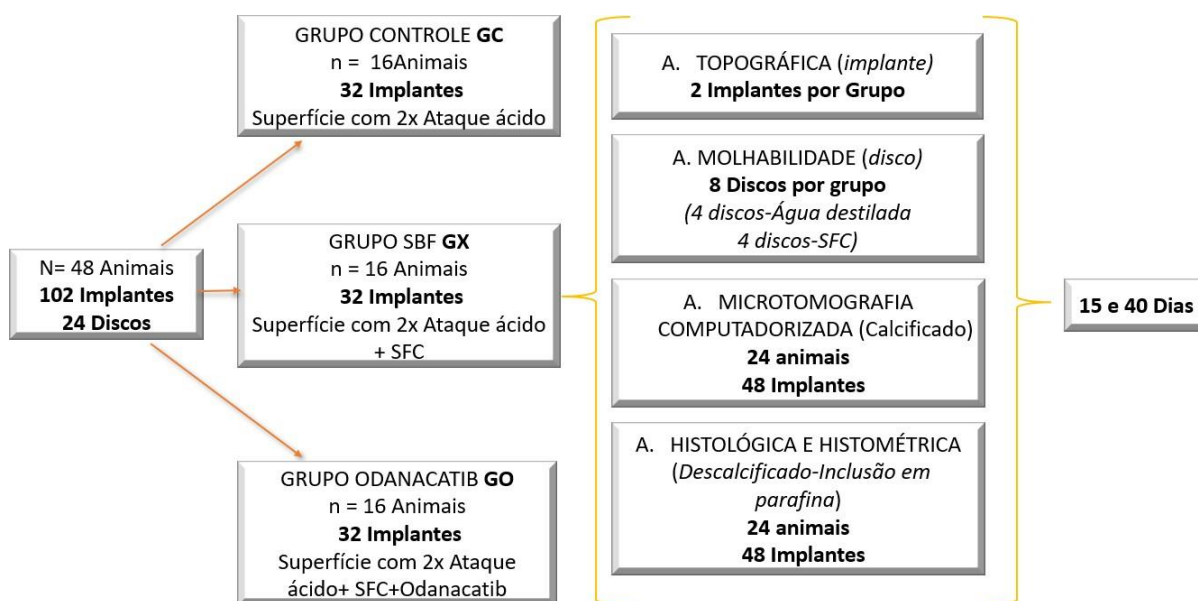
Grupos experimentais:

Grupo controle (GC): implante de titânio de superfície de duplo ataque ácido foi instalado em tíbia;

Grupo modificado por SFC (GX): implante de titânio com superfície modificada a base de SBF foi instalado em tíbia;

Grupo modificado por Odanacatib (GO): implante de titânio com superfície modificada a base de Odanacatib foi instalado em tíbia;

Figura 7 - Delineamento experimental referente análise óssea



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Os animais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 24^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo,

SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico.

3.3 Procedimento Cirúrgico

Após respeitado o jejum pré-operatório de 8 horas, os animais foram anestesiados por sedação via intramuscular com Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50 à 70 miligrama por quilo (mg/Kg), e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Posteriormente foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 mililitro por quilo (ml/Kg) na metáfise tibial.

A tricotomia bilateral e antissepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrol dona Iodo Degermante a 10%, com 1% de povidona-iodo (PVP-I) ativo a 10% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de PVP-I ativo a 10% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 8 A) foi realizada na região da tíbia. O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), uma incisão linear por planos anatômicos de 1 centímetro (cm) foi feita na região lateral da metáfise tibial (Figura 8 B). A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição da porção lateral da metáfase tibial (Figura 8 C).

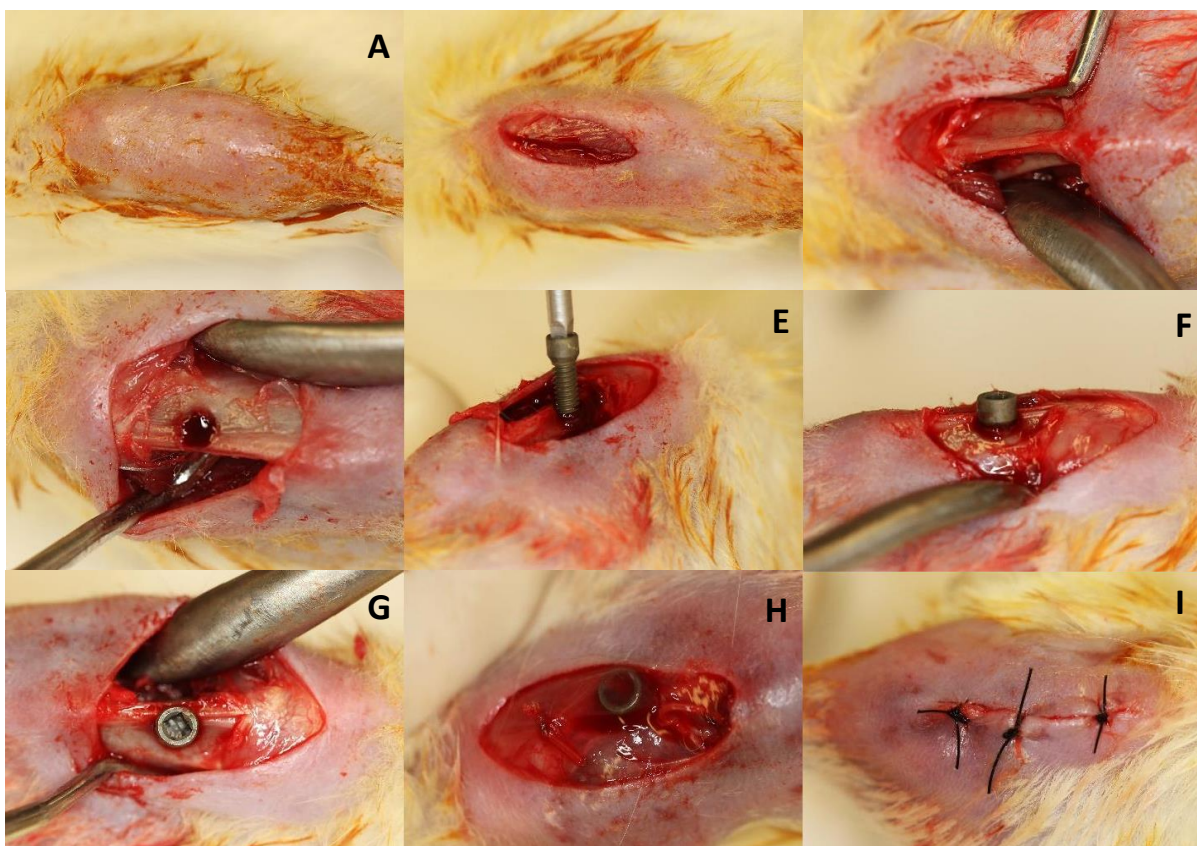
Após exposição do tecido ósseo foi realizada osteotomia bicortical com fresa espiral de 1,4 milímetro (mm) de diâmetro montada em contra ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, São Paulo, Brasil), conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rotação por minuto (rpm), sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 8 D).

Cada animal recebeu 2 implantes de titânio com travamento e estabilidade inicial, cada um de 1,6 mm de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil), sendo 1 em cada metáfise tibial. Nas tíbias foi instalado um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície modificada por duplo ataque ácido, modificado por SFC e pelo Odanacatib, seguindo os modelos estipulados: modelo 1: GC-tíbia direita e GX-tíbia esquerda, modelo 2: GX-tíbia direita e GO-tíbia esquerda, e modelo 3: GO-tíbia direita e GC-tíbia esquerda (Figura 8 E, F e G).

Finalizada a instalação do implante, o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos. O plano muscular foi suturado por pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). O plano cutâneo, a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 4-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) (Figura 8 H e I).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica 50 miligrama kilo dia (mg/kg/dia), Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

Figura 8 – Procedimento cirúrgico: Instalação dos implantes



Procedimento cirúrgico para a instalação dos implantes bilateral:

- A) Após tricotomia e antisepsia;
- B) Incisão linear na região da metáfise;
- C) Acesso à tíbia do animal;
- D) Osteotomia bicortical com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro;
- E) Instalação de implante de 1,6 x 3,0 mm de diâmetro, GC/GX e GO;
- F) Vista lateral de implante instalado bicorticalmente com estabilidade inicial;
- G) Vista superior de implante instalado bicorticalmente com estabilidade inicial;
- H) Sutura com fio vicryl 5.0 em músculo e periósteo; e
- I) Sutura com fio nylon 5.0 em pele.

Fonte elaborada pelo autor (2022)

3.4 Coleta Das Amostras

A eutanásia de 48 animais foi realizada nos períodos de 15 e 40 dias por dose excessiva de anestésico Tiopental (150mg/kg, Thiopentax, Itapira, São Paulo, Brasil) adicionado a lidocaína (4mg/kg, Xylestesin®, Itapira, São Paulo, Brasil), para a remoção das tíbias do animal com margem de 1 centímetro (cm) de tecido ósseo do implante dentário. As peças cirúrgicas foram fixadas por 48 horas em formol (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) neutro a 10% tamponado.

3.5 Análises Propostas

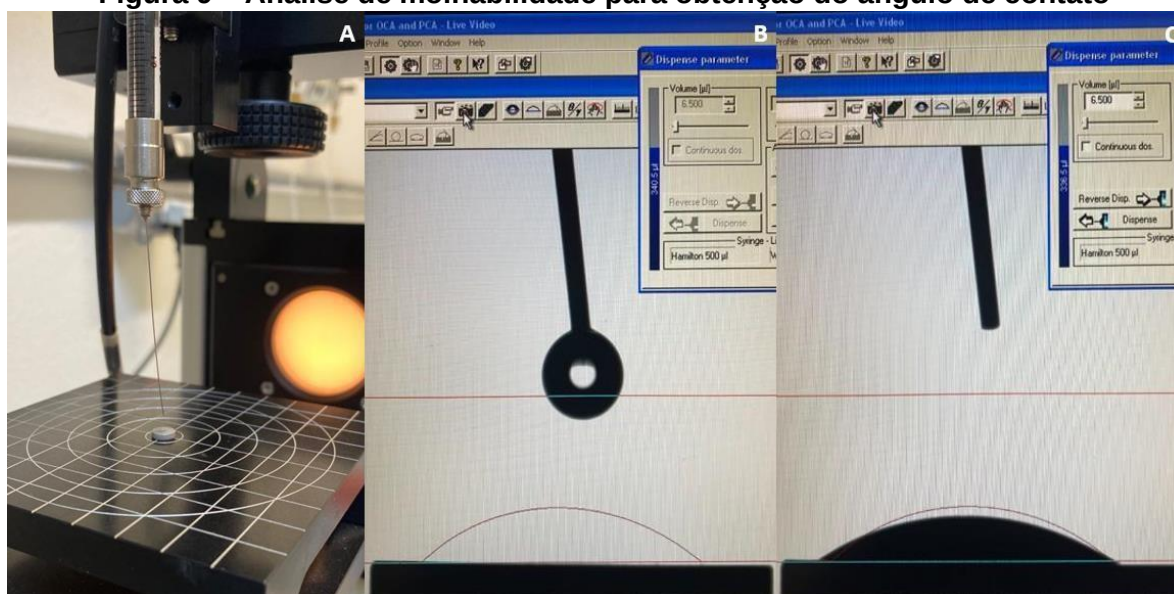
3.5.1 Análise de topográfica

Dois implantes de cada grupo experimental foram analisados quanto à topografia, previamente à instalação nas tíbias, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) com finalidade de avaliar a rugosidade superficial. A espectroscopia energia dispersiva de raio x (EDS) também foi realizada para avaliar a formação da película de óxido e sua composição química.

3.5.2 Análise de molhabilidade

Oito discos de cada grupo experimental foram analisados quanto à interação de contato de superfície pelo método da gota séssil, utilizando como soluções testes: água destilada e SFC (BRUZZONE *et al.*, 2008; YUAN; LEE, 2013). A medida do ângulo de contato foi feita com auxílio do goniômetro (DSA 100 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha), que capturou a gota séssil das soluções nas superfícies. O parâmetro adotado para o dispense foi com volume 6.500 μ l (microlitros), uma taxa de 5.00 em 4 segundos após o conato. Os cálculos e demais dados foram gerados pelo software (DSA4 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) e pelo registro fotográfico, em que foi fornecido o valor médio do ângulo de contato (θ) das diferentes superfícies para cada solução experimentais (Figura 9 A, B e C).

Figura 9 – Análise de molhabilidade para obtenção do ângulo de contato



- A) Disco de titânio posicionado no goniômetro;
- B) Dispense da solução sobre a superfície do disco de titânio; e
- C) Após os 4 segundos do primeiro contato com a gota;

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

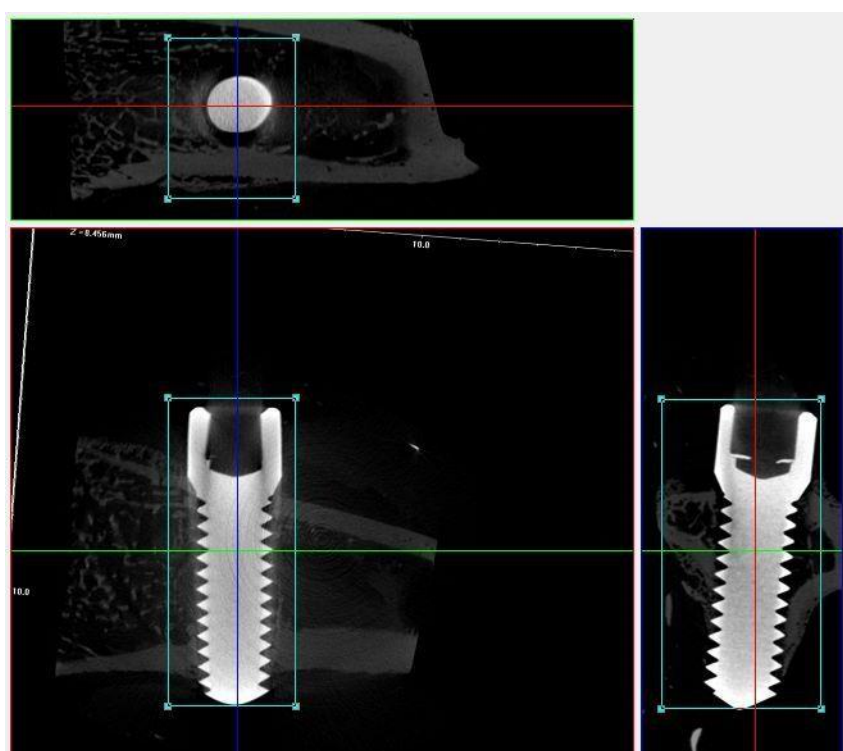
3.5.3 Microtomografia computadorizada

Na análise tridimensional as 24 peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas 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, em 380 slices, podendo ser observada em três planos: transversal, longitudinal e sagital. Em que foi selecionado a vista coronal e a área de interesse (Figura 10).

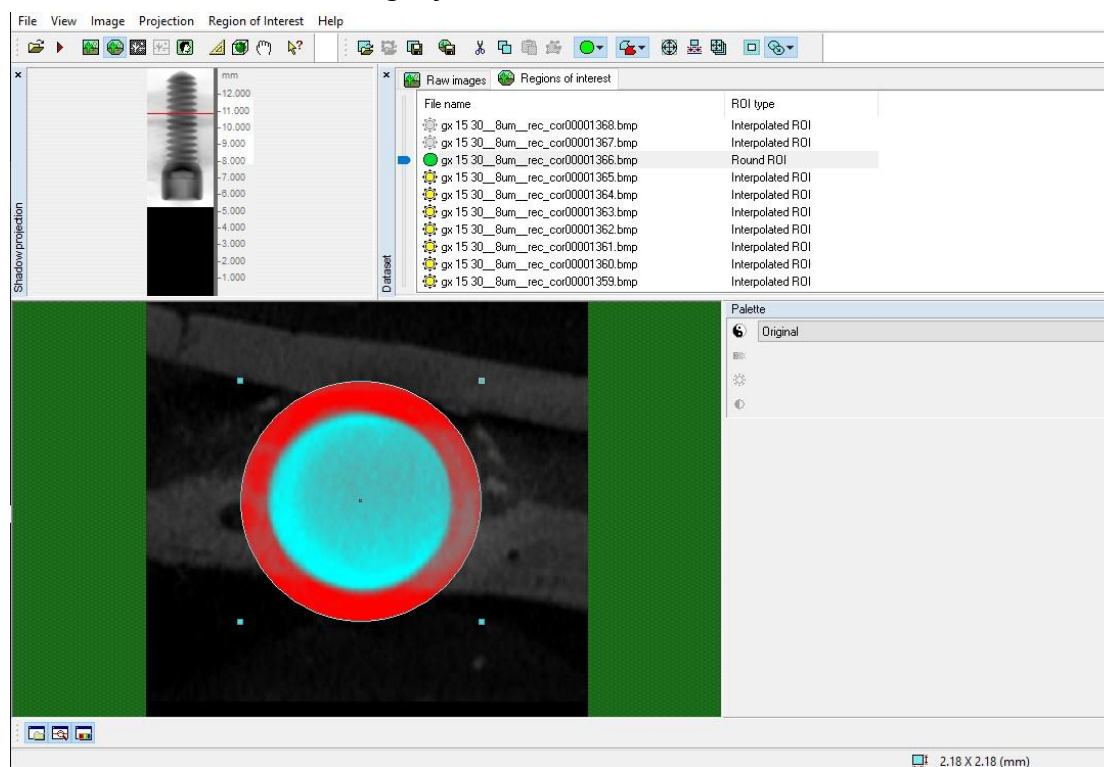
Em seguida, utilizando no software CTAnalyser – (CTAn) (2003- 11 SkyScan, 2012 Bruker Micro-CT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 2.18 x 2.18mm (Figura 11) e as imagens foram lidas através do threshold, utilizado uma escala de 23-255 tons de cinza, que possibilitou avaliar o volume de osso formado ao redor dos implantes.

Figura 10 - Seleção da área de interesse do implante em vista longitudinal, para avaliação em 3D da osseointegração



Fonte: Software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit)

Figura 11 - Seleção da área de interesse do implante em vista sagital, para avaliação em 3D da osseointegração, mostrando o ROI escolhido



Fonte: Software CTAnalyser – CTAn (2003- 11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0).

Seguindo as diretrizes do manual da Bruker, foram realizados os parâmetros de “porcentagem de volume ósseo” (BV/TV), “espessura do trabeculado ósseo” (Tb.Th), “número de trabéculas” (Tb.N), “separação das trabéculas” (Tb.Sp) e “densidade de conectividade” (Conn.D). Dentre outros, esses são os parâmetros que evidenciam o tecido ósseo de melhor qualidade (BOUXSEIN *et al.*, 2010).

3.5.4 Análise histológica e histométrica

Após as peças terem completado o período de 48 horas de fixação em formol 10% tamponado, as 48 amostras de tecido ósseo sofreram com o processo de descalcificação em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil), com trocas semanais da solução por um período de 6 semanas.

Após descalcificadas, as peças foram desidratadas utilizando uma sequência de álcoois 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II, 100 III e álcool/xilol (1:1) com trocas de hora em hora e diafanizadas com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada 1 hora e 45 minutos para posterior inclusão em parafina. Nesta etapa, após a inclusão, os implantes foram cuidadosamente removidos, a fim de não danificar o tecido periimplantar, seguido de uma nova inclusão em parafina para seu reposicionamento

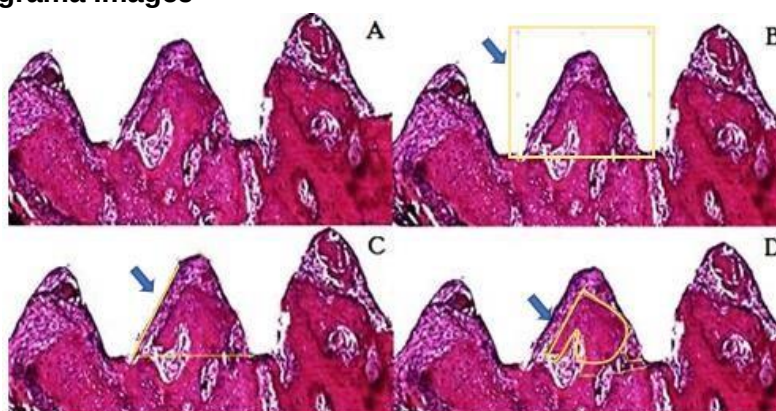
adequado. As peças foram levadas ao micrótomo para tecidos descalcificados, e assim foram obtidos cortes com 5 micrometro (μm) de espessura e montados em lâminas. As lâminas foram codificadas e um único examinador realizou as análises, cujo mesmo desconhecia o respectivo grupo experimental.

Após as lâminas serem coradas em hematoxilina e eosina (HE) foi realizada a mensuração utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá).

As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG e foram projetadas em na tela de um monitor Samsung (Sync Master 3Ne, 15 polegadas). Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens IMAGEJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido óssea, a superfície do implante (ELCOI) e a área de tecido ósseo neoformado (AON) entre as 4 espiras mais coronárias sendo 2 corticais e 2 medulares de cada lado do implante (Figura 12 A, B, C e D).

Figura 12 - Sequência da seleção da área de interesse do implante por meio do uso do programa ImageJ



- A) Vista da área interface osso/implante selecionada para a análise histológica;
- B) Seleção de espira pelo programa ImageJ;
- C) Cálculo da área total da espira;
- D) Cálculo da área óssea neoformada por meio da seleção do seu contorno.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

3.6 Análise Estatística

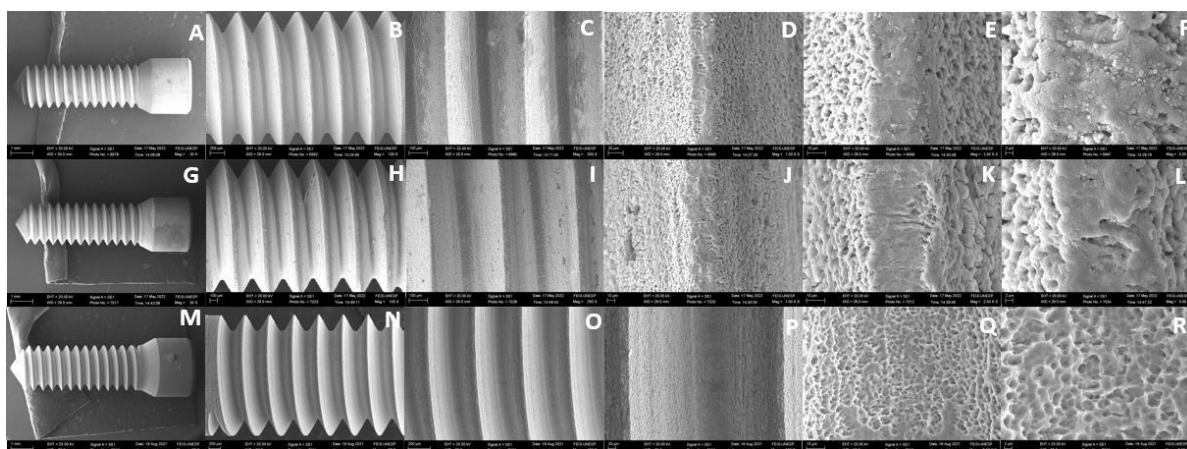
Os testes estatísticos foram conduzidos por meio do software GraphPad prism 8.0.1 (San Diego, CA, United States), em que os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) 2 fatores, com pós teste Tukey para os valores de ângulo de contato, parâmetros de microtomograficos e histométricos adotando o nível de significância (p) ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Topográfica

Na análise de MEV foi possível observar que os 3 grupos experimentais apresentaram uma superfície rugosa, irregular e homogênea. homogênea (Figura 13 A-E, G-K, M-Q). Em maior aumento é possível observar que os grupos GX e GO apresentam uma morfologia de superfície com poros espessos e recoberta por formações globulares e presença de partículas de hidroxiapatita (Figura 13 F, L e R).

Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais dos Grupos: GC, GX e GO



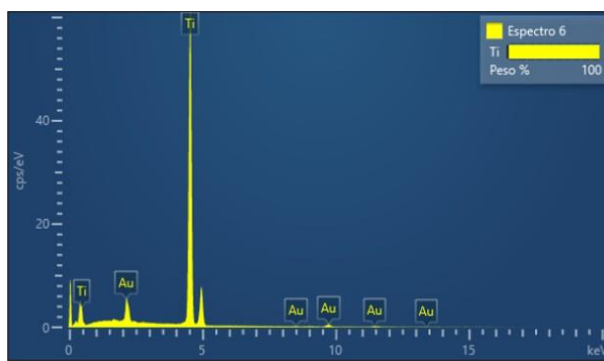
- A) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 30x;
- B) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 100x;
- C) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 250x;
- D) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 1.00 kx;
- E) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 2.50 kx;
- F) Superfície revestida com SFC com Odanacatib (GO), em aumento de 5.00 kx;
- G) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 30x;
- H) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 100x;
- I) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 250x;
- J) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 1.00 kx;
- K) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 2.50 kx;
- L) Superfície revestida com SFC (GX), em aumento de 5.00 kx
- M) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 30x;
- N) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 80x;
- O) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 150x;
- P) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 500x.
- Q) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 2.50 kx
- R) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GC), em aumento de 5.00 kx

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

Na análise de EDS o grupo GC apresentou uma superfície de Titânio (Ti) puro (100%) (Figura 14). Os grupos GX e GO apresentaram presença de outras substâncias em diferentes concentrações (Figura 15 e 16). O grupo GX apresentou

maiores concentrações de Ti (41,04%) e Cálcio (15,21%) (Figura 15), ao passo que o grupo GO apresentou 64,99% de Ti e 11,64% de Oxigênio. A presença do elemento ouro (Au) em todos os grupos é resultante da própria análise (Figura 14), (Figura 15) e (Figura 16).

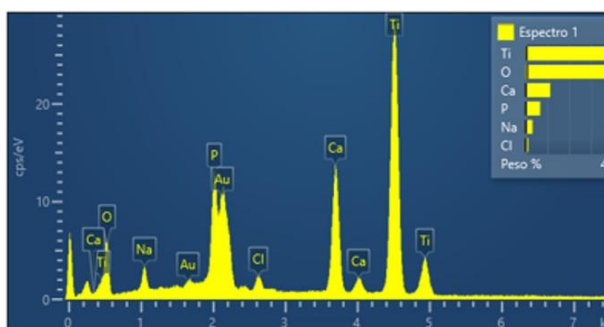
Figura 14 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GC



Elemento	Tipo de Linha	Concentração Aparente	Razão k	Peso%	Sigma de Peso%	Rótulo Padrão	Padrão de Fábrica
Ti	Série K	103.65	1.03649	100.00	0.00	Ti	Sim
Total:				100.00			

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

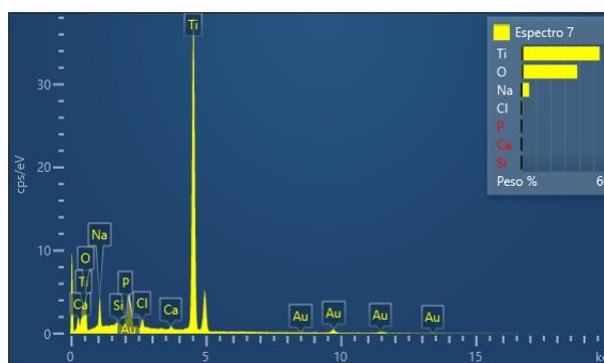
Figura 15 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GX



Elemento	Tipo de Linha	Concentração Aparente	Razão k	Peso%	Sigma de Peso%	Rótulo Padrão	Padrão de Fábrica
O	Série K	11.21	0.03771	38.76	0.74	SiO2	Sim
Na	Série K	2.28	0.00962	3.14	0.14	Albite	Sim
P	Série K	11.10	0.06210	6.64	0.15	GaP	Sim
Cl	Série K	1.23	0.01077	1.08	0.06	NaCl	Sim
Ca	Série K	15.21	0.13590	11.26	0.17	Wollastonite	Sim
Ti	Série K	41.04	0.41036	39.12	0.50	Ti	Sim
Total:				100.00			

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

Figura 16 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GO



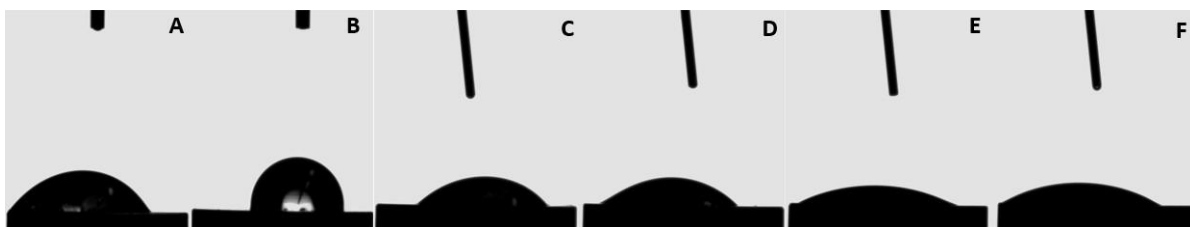
Elemento	Tipo de Linha	Concentração Aparente	Razão k	Peso%	Sigma de Peso%	Rótulo Padrão	Padrão de Fábrica
O	Série K	11.64	0.03918	38.65	0.71	SiO2	Sim
Na	Série K	3.99	0.01683	5.35	0.15	Albite	Sim
Si	Série K	0.21	0.00169	0.20	0.04	SiO2	Sim
P	Série K	0.85	0.00473	0.48	0.06	GaP	Sim
Cl	Série K	0.98	0.00859	0.77	0.04	NaCl	Sim
Ca	Série K	0.45	0.00404	0.29	0.04	Wollastonite	Sim
Ti	Série K	64.99	0.64985	54.25	0.64	Ti	Sim
Total:				100.00			

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

4.2 Análise De Molhabilidade

As superfícies experimentais dos grupos GX e GO apresentaram ângulo de contato correspondente a classificação hidrofílica, conferindo um ângulo inferior a 90°, para ambas as soluções testadas (água destilada e SFC). O GO, por sua vez, apresentou um perfil de maior interação com as soluções, como é possível observar nas imagens a seguir em que houve maior espreadimento dos líquidos em sua superfície em relação ao GX (Figura 17 C-F). Já o GC apresentou perfil hidrofílico apenas na solução de água destilada, no SFC apresentou um ângulo superior a 90° mostrando menor interação da solução com a superfície em relação aos demais grupos (Figura 17 A e B) (Gráfico 1).

Figura 17 – Obtenção do ângulo de contato

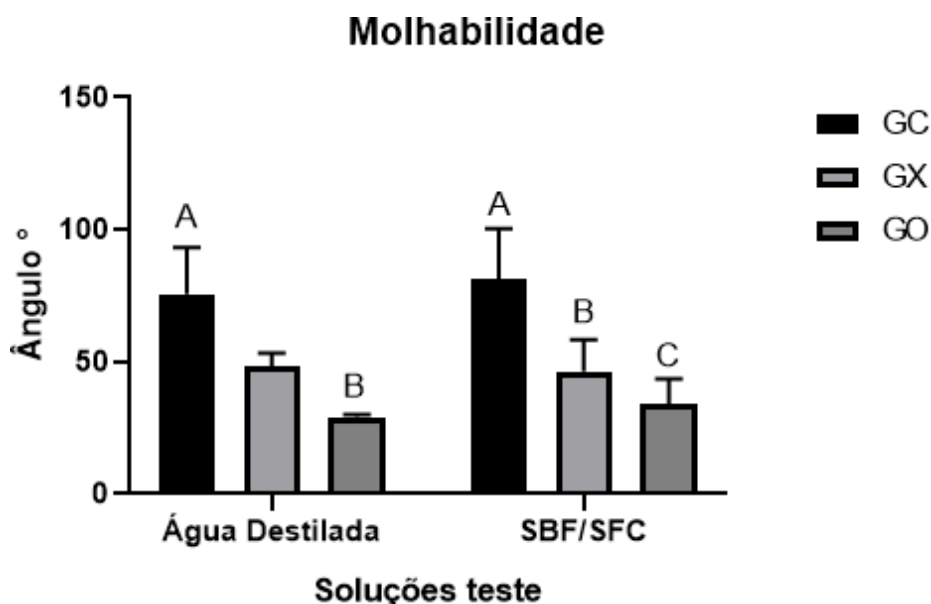


- A) Ângulo de contato de 52,3° obtido no GC com a solução de água destilada;
- B) Ângulo de contato de 90,7° obtido no GC com SFC;
- C) Ângulo de contato de 49,9° obtido no GX com a solução de água destilada;
- D) Ângulo de contato de 45,7° obtido no GX com SFC;
- E) Ângulo de contato de 29,4° obtido no GO com a solução de água destilada; e
- F) Ângulo de contato de 31,4° obtido no GO com SFC;

Fonte: Tensiômetro óptico de ângulo de contato (2021)

Na comparação intergrupos foi possível observar que houve diferença estatística entre o GC e o GO para a solução de água destilada ($p=0,0007$), e para SFC entre os grupos GC e GX ($p=0,0145$) e GC e GO ($p=0,0007$), revelando que o GO apresentou melhor interação de ambas as soluções em sua superfície (Gráfico 1) (Tabela 1).

Gráfico 1 - Análise de molhabilidade



Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2021)

Tabela 1 – Análise estatística da avaliação do ângulo de contato

Soluções	GC	GX	GO	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Água Destilada	73,2 ± 17,5 ^A	49,9 ± 5,0	29,4 ± 0,9 ^B	0,0007 ^{A,B*}
SFC	90,3 ± 19,2 ^A	45,7 ± 11,8 ^B	31,4 ± 9,3 ^C	0,0145 ^{A,B*} 0,0007 ^{A,C*}

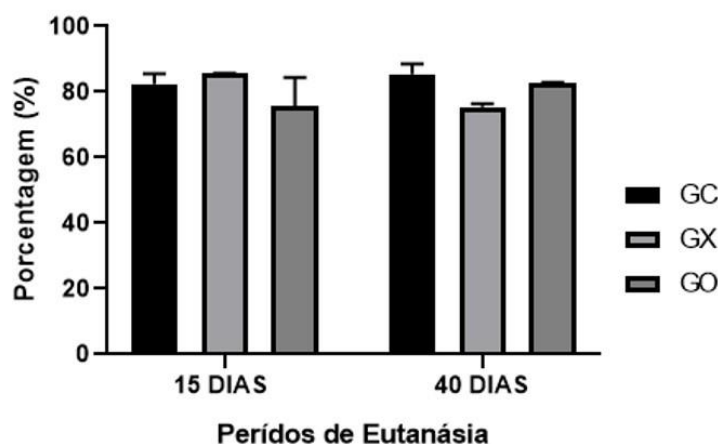
* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão;

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2021)

4.3 Análise de Microtomografia Computadorizada

Na análise de micro-ct referente BV.TV foi possível observar que os grupos GX e GC apresentaram valores semelhantes e superiores ao GO no período de 15 dias. No entanto aos 40 dias os grupos GC e GO apresentam superiores ao GX (Gráfico 2) (Quadro 1). No entanto não houve diferença estatística significativa inter e intragrupos, indicando um perfil de equivalência.

Gráfico 2 – Parâmetro BV/TV
BV/TV



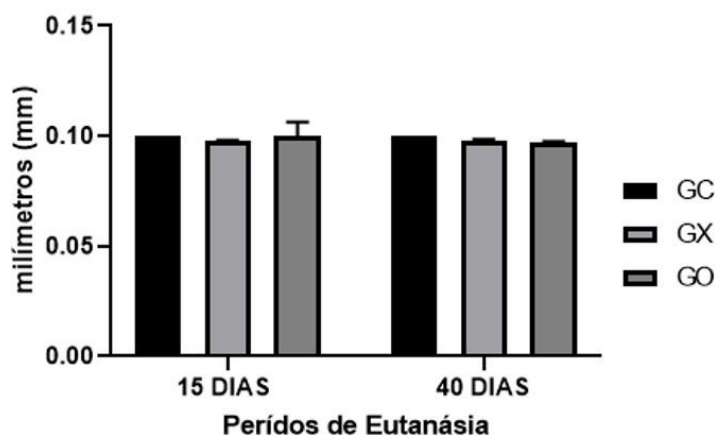
Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Quadro 1 - Parâmetro BV/TV

BV/TV		
Grupo	Período	Média/DP
GC	15 dias	82,47±3,05
GC	40 dias	85,43±3,15
GX	15 dias	85,67±0,06
GX	40 dias	75,4±1,00
GO	15 dias	75,83±8,52
GO	40 dias	82,7±0,23

Nos parâmetros relacionados à Tb.Th revelou que os três grupos experimentais apresentaram valores semelhantes aos 15 e 40 dias (Gráfico 3) (Quadro 2). Não houve diferença estatística significativa inter e intragrupos, indicando um perfil de equivalência.

Gráfico 3 – Parâmetro Tb.Th
Tb.Th



Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

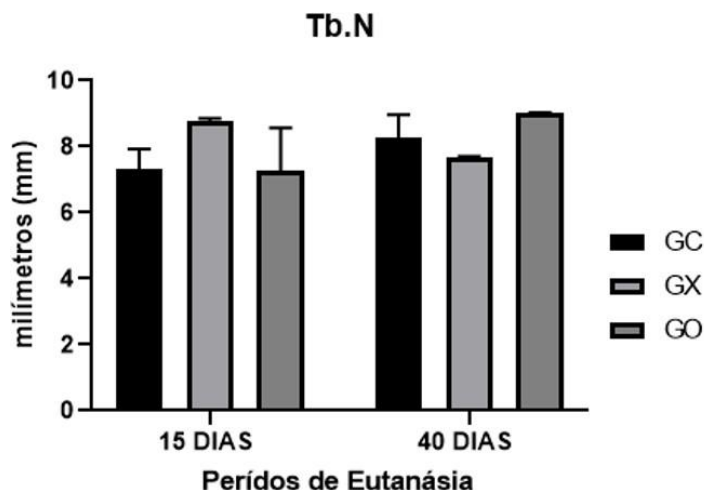
Quadro 2 - Parâmetro Tb.Th

Tb.Th		
Grupo	Período	Média/DP
GC	15 dias	0,10±0,00
GC	40 dias	0,10±0,00
GX	15 dias	0,09±0,00
GX	40 dias	0,9±1,00
GO	15 dias	0,10±8,52
GO	40 dias	0,10±0,00

Para os valores de Tb.N foi possível observar que os grupos GC e GO aos 15 dias apresentaram valores semelhantes e inferiores em relação ao GX. Aos 40 dias observou-se o comportamento inverso, em que o GX apresentou valor inferior em relação aos grupos GC e GO (Gráfico 4) (Quadro 3). Não houve

diferença estatística significativa inter e intragrupos, indicando um perfil de equivalência.

Gráfico 4 – Parâmetro Tb.N



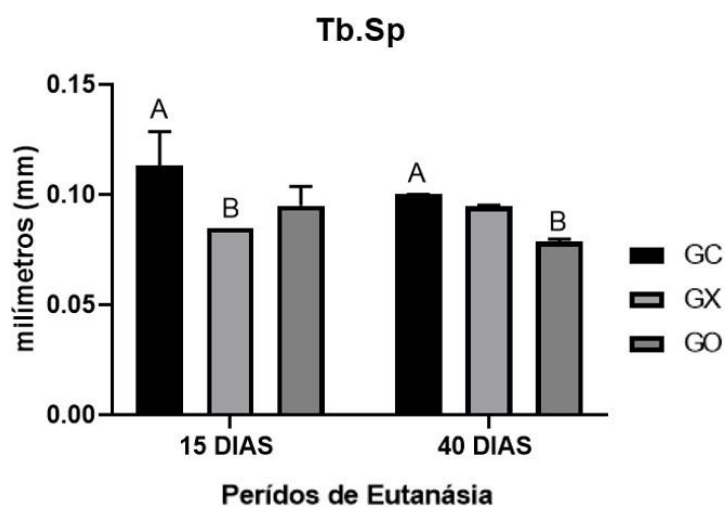
Quadro 3 - Parâmetro Tb.N

Tb.N		
Grupo	Período	Média/DP
GC	15 dias	7,33±0,60
GC	40 dias	8,26±0,69
GX	15 dias	8,75±0,10
GX	40 dias	7,67±0,03
GO	15 dias	7,28±1,28
GO	40 dias	9,00±0,03

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Correspondente ao parâmetro Tb.sp o GC se destacou em ambos os períodos de eutanásia, apresentando diferença estatística significativa intergrupos aos 15 dias para o GC com o GX ($p=0,0043$), aos 40 dias com o GO ($p=0,0314$). Em que o perfil de melhor qualidade óssea, aos 15 dias para o GX e 40 dias para o GO (Gráfico 5) (Quadro 4) (Tabela 2).

Gráfico 5 – Parâmetro Tb.sp



Quadro 4 - Parâmetro Tb.sp

Tb.sp		
Grupo	Período	Média/DP
GC	15 dias	0,11±0,01
GC	40 dias	0,10±0,00
GX	15 dias	0,08±0,00
GX	40 dias	0,09±0,00
GO	15 dias	0,09±0,00
GO	40 dias	0,08±0,00

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

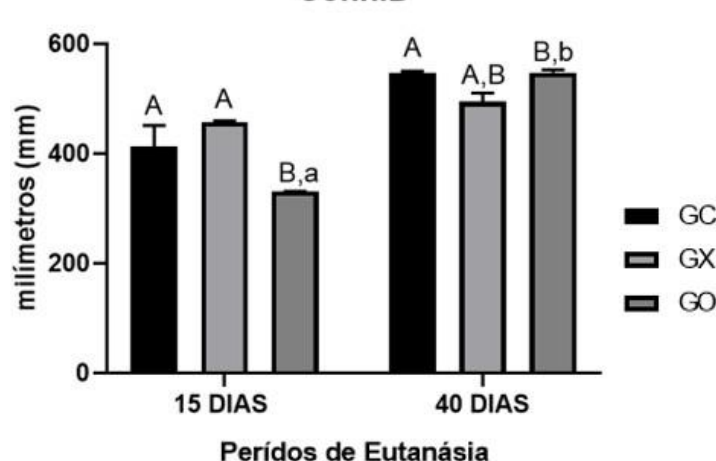
Tabela 2 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.sp

Períodos	GC	GX	GO	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
15 Dias	0,11 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,00 ^B	0,09 ± 0,00	0,0043 ^{A,B*}
40 Dias	0,10 ± 0,01 ^A	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00 ^B	0,0314 ^{A,B*}

* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO AWAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão.

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Para a avaliação da Conn.Dn foi possível observar que todos os grupos apresentaram valores superiores aos 40 dias em relação aos 15 dias, com diferença estatística significativa aos 15 dias na comparação intergrupos para GC com GO ($p=0,0008$) e GX com GO ($p<0,0001$). Aos 40 dias para GC com GX ($p=0,0236$) e GX com GO ($p=0,0227$). Na comparação intragrupos obteve-se diferença estatística significativa no GO de 15 dias com 40 dias ($p<0,0001$) (Gráfico 6) (Quadro 5) (Tabela 3). Em que é possível destacar o perfil de melhor qualidade óssea para GX aos 15 dias e o GO aos 40 dias.

Gráfico 6 – Parâmetro Conn.Dn**Quadro 5 - Parâmetro Conn.Dn**

Conn.D		
Grupo	Período	Média/DP
GC	15 dias	413,00±38,20
GC	40 dias	547,67±2,47
GX	15 dias	457,17±2,47
GX	40 dias	494,85±15,49
GO	15 dias	331,03±0,11
GO	40 dias	547,97±4,82

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Tabela 3 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Conn.Dn

Períodos	GC	GX	GO	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
15 Dias	413,00 ± 38,20 ^A	457,17 ± 2,47 ^A	331,03 ± 0,11 ^{B,a}	0,0008 ^{A,B*} <0,0001 ^{A,B*} <0,0001 ^{a,b*}
40 Dias	547,67 ± 2,47 ^A	494,85 ± 15,49 ^{A,B}	547,97 ± 4,82 ^{B,b}	0,0236 ^{A,B*} 0,0227 ^{A,B*} <0,0001 ^{a,b*}

* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO AWAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão.

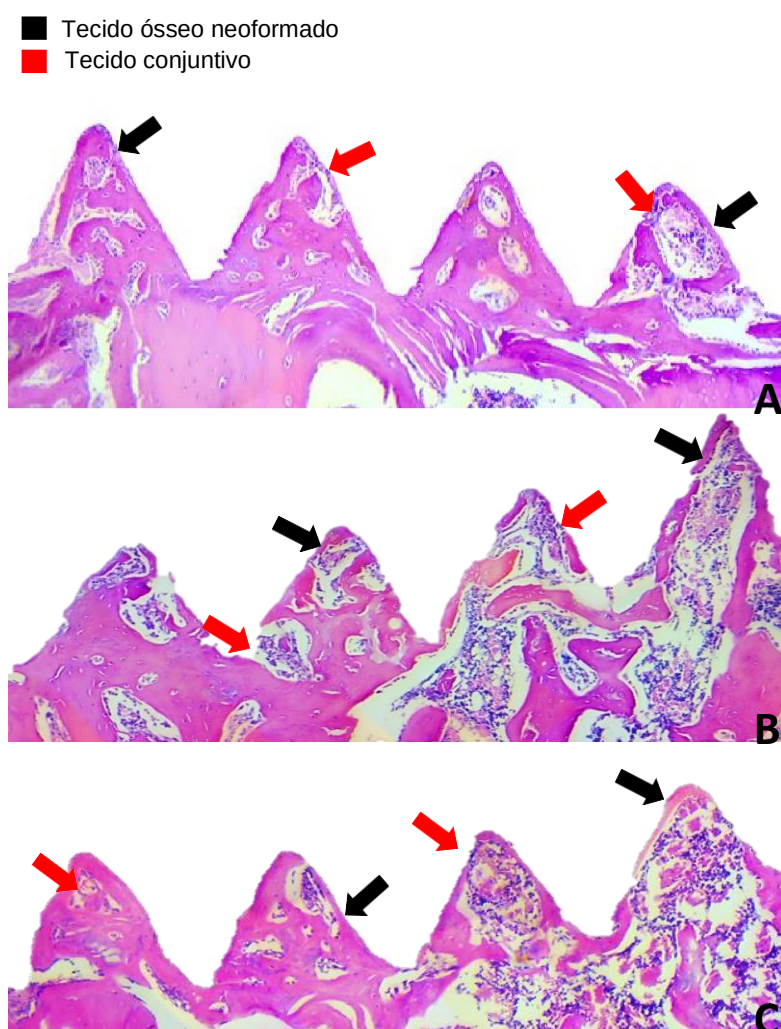
Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

4.4 Análise Histológica e Histométrica

4.4.1 Análise histológica

No período de 15 dias observou-se que os grupos estudados revelaram um comportamento semelhante entre si no quesito de angiogênese e osteogênese, apresentando um trabeculado fino neoformado com presença de células osteoblásticas em sua periferia, localizado homogeneamente nas regiões de interface osso/implante e no interior da espira. Além de expressar ilhas de tecido conjuntivo e matriz osteóide entremeadas às áreas de tecido ósseo neoformado (Figura 18 A, B e C).

Figura 18 – Análise histológica dos grupos experimentais aos 15 dias

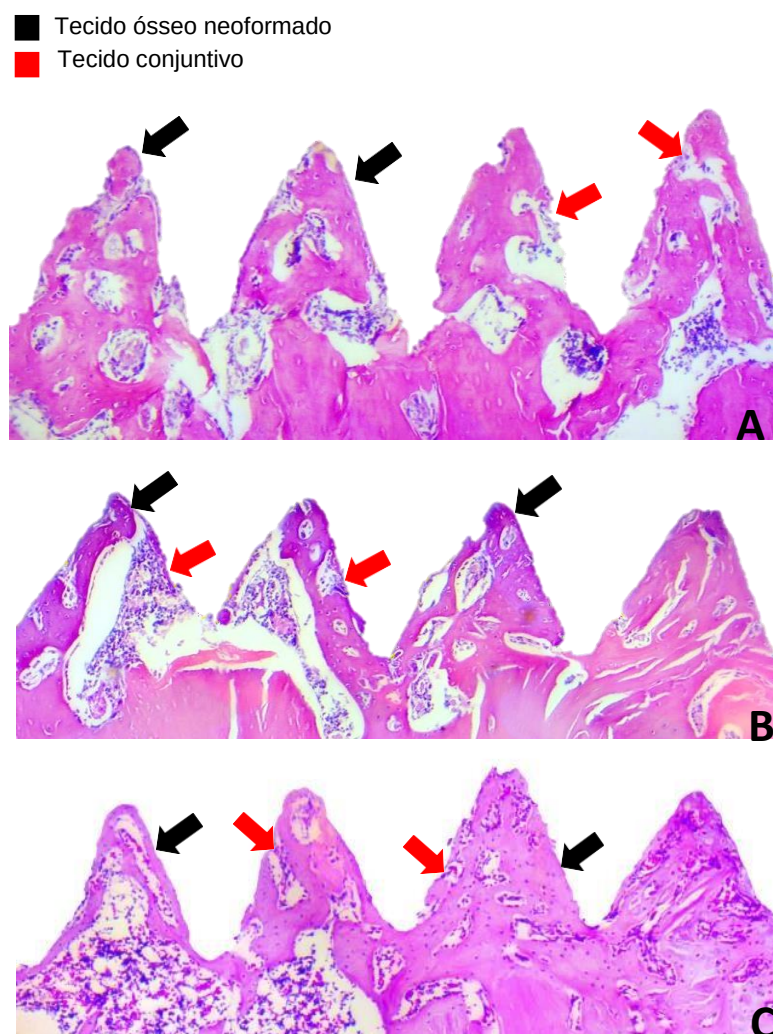


- A) Avaliação histológica do GC aos 15 dias de eutanásia;
- B) Avaliação histológica do GX aos 15 dias de eutanásia; e
- C) Avaliação histológica do GO aos 15 dias de eutanásia.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Aos 40 dias foi possível observar que todos os grupos apresentaram uma predominância de tecido ósseo neoformado no interior das espiras e corticalização na interface osso/implante, apontando o aumento progressivo de tecido ósseo e diminuição das ilhas de tecido conjuntivo. Em que foi possível destacar, no GO, a interface contínua de corticalização e área de neoformação óssea, com menor presença de ilhas de tecido conjuntivo no interior das espiras (Figura 19 A-C).

Figura 19 – Análise histológica dos grupos experimentais aos 40 dias



- A) Avaliação histológica do GC aos 40 dias de eutanásia;
 B) Avaliação histológica do GX aos 40 dias de eutanásia; e
 C) Avaliação histológica do GO aos 40 dias de eutanásia.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

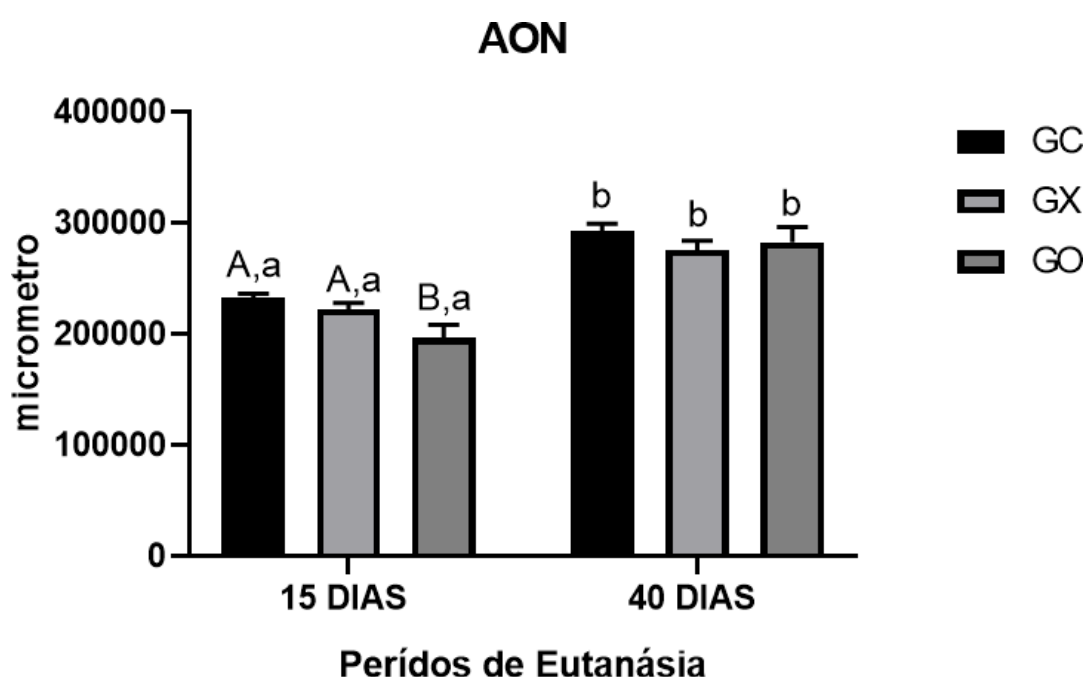
4.4.1 Área óssea neoformada (AON)

Na avaliação de AON foi possível observar diferença estatística significativa na comparação intergrupos no período de 15 dias para o GC com o GO

($p=0,035$) e para o GX com o GO ($p=0,0347$). Indicando que o GC e GX destacaram-se em relação ao GO no quesito de área óssea neoformada aos 15 dias.

Na comparação intragrupos, também foi possível observar diferença estatística significativa entre os períodos de 15 dias e 40 dias para o GC ($p<0,0001$), para o GX ($p=0,0001$) e GO ($p<0,0001$), indicando que os três grupos estudados se destacaram de forma individual aos 40 dias em relação aos 15 dias (Gráfico 7) (Tabela 4).

Gráfico 7 – Análise histométrica para os valores de área óssea neoformada (AON)



Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Tabela 4 – Análise histométrica para os valores de área óssea neoformada (AON)

Períodos	GC	GX	GO	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
15 Dias	232389±3619 ^{A,a}	222291±5612 ^{A,a}	196189±12049 ^{B,a}	0,0035 ^{A,B*} 0,0347 ^{A,B*} 0,0001 ^{a,b*} 0,0001 ^{a,b*} 0,0001 ^{a,b}
40 Dias	292735±6321 ^b	275583±8183 ^b	282596±13524 ^b	<0,0001 ^{a,b*} 0,0001 ^{a,b*} 0,0001 ^{a,b*}

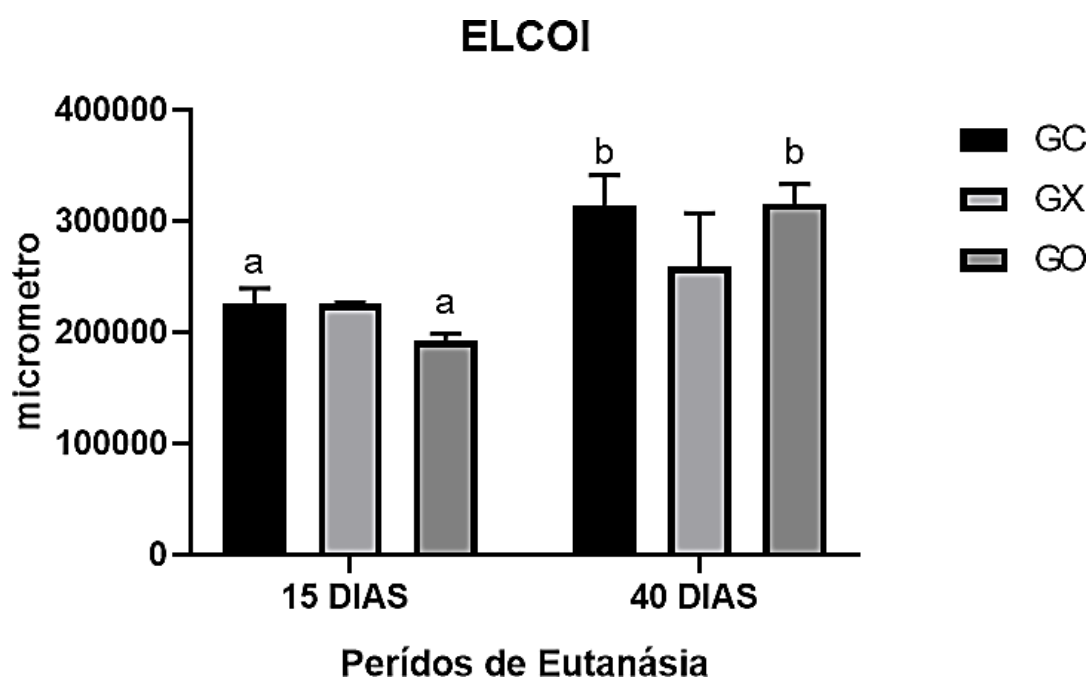
* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO AWAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão.

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

4.4.2 Extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI)

Na avaliação de ELCOI foi possível observar diferença estatística significativa na comparação intragrupos entre os períodos de 15 e 40 dias para o GC ($p=0,0089$) e para o GO ($p=0,005$), indicando que os grupos GC e GO apresentaram um aumento significativo na corticalização de superfície na região de interface osso/implante (Gráfico 8) (Tabela 5).

Gráfico 8 – Análise histométrica para os valores de extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI)



Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Tabela 5 – Análise histométrica para os valores de extensão linear de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante (ELCOI)

Períodos	GC	GX	GO	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
15 Dias	225972 ± 13386 ^a	225707 ± 995	192145 ± 6483 ^a	0,0089 ^{a,b*} 0,005 ^{a,b*}
40 Dias	313669 ± 27483 ^b	259090 ± 48158	315494 ± 17546 ^b	0,0089 ^{a,b*} 0,005 ^{a,b*}

* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO AWAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão.

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de analisar a resposta óssea de uma superfície de implante modificada com Odanacatib, comparando-a com a superfície de duplo ataque ácido e biomimética em condições normofisiológicas. De acordo com a hipótese proposta, os resultados foram esclarecedores para entender o comportamento das superfícies testadas, atribuindo uma visão mais precisa diante das alterações microestruturais do tecido ósseo neoformado, em que foi possível avaliar a efetividade tópica do Odanacatib no processo de osseointegração.

Os resultados obtidos pelas análises de superfície nos direcionaram para mapear as características morfológicas e as propriedades físico-químicas encontradas em cada tratamento de superfície. Para isso, os resultados obtidos pelas análises de MEV, EDS e molhabilidade foram fundamentais para se entender o comportamento biológico apresentados nas análises histológica, histométrica e microtomográfica.

Estudos revelam que os tratamentos de superfície de implante com perfil rugoso e irregular resultam no aumento da área de contato, em que os poros e as interconexões tridimensionais proporcionam uma via de acesso para as células aderirem e proliferarem, otimizando o processo de angiogênese e osteogênese, favorecendo a deposição da matriz óssea (ZHAO *et al.*, 2006, 2007; MAZZO *et al.*, 2012). Além disso, a superfície tratada pelo método biomimético é descrita por apresentar poros interligados, de maior diâmetro, com uma morfologia globular e com precipitação de partículas de hidroxiapatita (MACHADO 2008; GANDOLFI *et al.*, 2015; CORREA, 2018). O mesmo perfil de rugosidade e irregularidade foram observados nos três grupos experimentais, ademais, os grupos GX e GO apresentaram poros espessos, de aspecto globular e com precipitação de partículas de hidroxiapatita.

Na análise de EDS os grupos GC e GX corresponderam a mesma composição química encontrada nos protocolos de tratamento de superfície na literatura. Em que a superfície ácida referiu apenas o elemento Ti e no método biomimético elementos: Ca, Na, O e P, que realizam trocas iônicas entre si permitindo a precipitação da hidroxiapatita (MACHADO 2008; QUEIROZ *et al.*, 2013; FIGUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018; CORREA, 2018). Por sua vez, embora o GO, tenha

mantido os elementos químicos derivados do tratamento biomimético, as quantidades não foram equivalentes. No entanto, este dado não afetou negativamente a resposta biológica da superfície e mesmo que não haja resultados que partilhem da mesma metodologia para comparação, um estudo de Khan *et al.* (2016) avaliou a quantidade de Ca/P por meio do condicionamento ósseo sistêmico em coelhos, e revelou que o grupo OVX tratado por Odanacatib apresentou resultado superior em relação ao tratamento com alendronato e equivalentes ao grupo SHAM.

Uma vez que as características topográficas e a composição físico-químicas influenciam no nível de interação das moléculas na superfície e adsorção de componentes do sangue. A superfície tratada com Odanacatib conferiu melhores propriedades físico-químicas ao apresentar os menores ângulos de contatos, revelando possuir maior capacidade de absorção e afinidade com as soluções testes (água destilada e SFC). Em contrapartida, a superfície de duplo ataque ácido apresentou resultados estatisticamente inferiores em relação ao GO em ambas as soluções testes e com GX para o SFC, indicando que os grupos tratados pelo método biomimético com ou sem deposição de Odanacatib apresentam maior probabilidade de adesão e proliferação celular. Corroborando com os estudos de molhabilidade presentes na literatura, que destacam as superfícies biomiméticas com deposição de CaP e alendronato (antirreabsortivo) em relação ao duplo ataque ácido (FIGUEIRA-JÚNIOR, 2018 e BARBOSA 2016;).

A partir das análises de mapeamento das propriedades das superfícies, a microtomografia computadorizada permite avaliar a qualidade e potencial de formação óssea, através da leitura dos valores dos parâmetros. No perfil favorável à osseointegração observa-se o aumento de Bv.Tv, Tb.Th, Tb.TN, Conn.Dn e diminuição de Tb.sp. No presente estudo foi possível observar que entre os períodos de 15 e 40 dias o GO apresentou um aumento substancial para os parâmetros Bv.Tv, Tb.Th, Tb.TN, além de apresentar diferença estatística intragrupo e com o GX aos 40 para Conn.Dn, e entre o GC para o valor de Tb.sp aos 40 dias, reafirmando seu potencial de formação e qualidade óssea.

Correlacionando com os achados literários, um estudo de Yi e colaboradores (2017) ao avaliar a resposta óssea após instalação de implantes em fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com doses de 5mg/kg e 30mg/kg de Odanacatib, observou melhores resultados microtomográficos no grupo OVX tratado

com a maior dose de Odanacatib e no grupo SHAM, em que os mesmos não apresentaram diferença estatística para os parâmetros de Bv.Tv, Tb.Th e Tb.N. Assim como no estudo realizado por Khan e colaboradores (2016), observou que o tratamento com Odanacatib, em coelhos ovariectomizadas, restaurou os parâmetros de Conn.Dn, Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp para o nível fisiológico, comprovando a efetividade do tratamento do Odanacatib.

Os demais grupos experimentais também apresentaram equivalência para os parâmetros Bv.Tv, Tb.Th, Tb.TN, corroborando com os estudos na literatura para as superfícies de duplo ataque ácido e biomimético com e sem impregnação de antirreabsortivos (SANCHES, 2022; CORREA, 2018). Ademais na avaliação de Conn.Dn foi possível interpretar que o GC apresentou resultados estatísticos significantes em ambos por períodos indicando possuir maior densidade de conexão entre as trabéculas, se equiparando com GX aos 15 dias e com GO aos 40 dias.

No entanto o GC também apresentou diferença estatística em ambos os períodos de eutanásia para o parâmetro de Tb.Sp, se destacando por apresentar maior espaçamento trabecular. Corroborando com os dados encontrados no estudo de Sanches e colaboradores (2022), que embora não tenha apresentado diferença estatística o grupo de duplo ataque ácido se destacou aos 40 dias em relação a superfície biomimética com deposição de antirreabsortivo.

A correlação entre a análise histométrica e microtomográfica é importante para contrastar os dados quantitativos. Em que foi possível observar que todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatística significantes intragrupos para a AON e ELCOI, destacando GO, que mesmo apresentado menor neoformação e corticalização aos 15 dias, aos 40 dias se equipaleu-se aos demais grupos experimentais, em concordância com o perfil encontrado pelo GO na micro-ct e na análise histológica. Corroborando com o estudo de Yi e colaboradores (2017), em que o grupo tratado com maior dose (30mg/kg) de Odanacatib apresentou um aumento significativo da AON e do ELCOI, se assemelhando aos valores encontrados pelo grupo SHAM, além de garantir o equilíbrio do turnover ósseo em condições sistêmicas.

Os resultados histométricos dispostos na literatura comparando as superfícies de duplo ataque ácido e biomimética com deposição de compostos osteocondutores e fármacos antirreabsortivos, no critério de corticalização de superfície, não foram observadas diferenças estatísticas. No entanto, referente a

AON os resultados divergem de acordo com o composto e devido a metodologia empregada, tendo a fase de maior propensão a diferença estatística o período de 40 dias.

No estudo de Correa (2018) para as superfícies biomimética com e sem deposição de beta-tricálcio fosfato, nos períodos de 15 e 40 dias para AON e ELCOI, ambas apresentaram equivalência entre si. Já no estudo comparativo entre a superfície modificada por duplo ataque ácido e a superfície biomimética modificada por raloxifeno foi possível observar diferença estatística aos 40 dias, em que o grupo duplo ataque ácido apresentou maior AON, e para os valores de ELCOI ambos os grupos apresentaram equivalência (SANCHES, 2020). Em outro estudo com deposição de alendronato, foi possível observar que houve diferença estatística aos 15 dias e aos 40 dias, indicando que o grupo biomimético apresentou maior AON em relação ao grupo de duplo ataque ácido (FIGUEIRA-JÚNIOR, 2018).

Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que as três superfícies abordadas favoreceram o processo de osseointegração, evidenciando a influência da deposição biomimética do Odanacatib na superfície de implantes de titânio, que por sua vez, conferiu um perfil topográfico, características físico-químicas e parâmetros micromotográficos favoráveis aos processos de osteocondução e osteogênese. Além de apresentar, histométricamente, o aumento da área óssea neoformada e de corticalização de superfície em relação aos 15 dias, atribuindo um quadro de equivalência aos 40 dias com os demais grupos experimentais.

Este estudo abre novos campos de pesquisa para novas análises como de imunoistoquímica para avaliar o perfil inflamatório e as células osteogênicas, visto que o Odanacatib não altera a expressão e não inibe todas as funções exercidas pelos osteoclastos. A coloração de Picro Sirius Red em peças descalcificadas para mapear as fibras colágenas, que tem sua degradação inibida pelo mecanismo de ação do Odanacatib e análise cultura de células em discos de titânio, com o intuito de desenvolver e aprimorar protocolos para abranger uma visão a nível célula em linhagem primária.

Além da realização de estudos comparativos para avaliar para a dinâmica da resposta óssea em organismos com alteração de metabolismo ósseo, trazendo uma visão mais completa inteirando as análises já realizadas, com intuito de acrescentar na literatura estudos de ação tópica.

6 CONCLUSÃO

As modificações de superfície propostas neste trabalho se mostraram eficazes para osseointegração de implantes em organismos normofisiológicos. Os resultados com o tratamento tópico de Odanacatib conferiram resultados otimizados nas análises de topografia, ângulo de contato, microtomografia, área óssea neoformada e corticalização na região de interface osso/implante, apresentando um aumento substancial dos 15 aos 40 dias.

REFERÊNCIAS

- Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *J Mater Sci Mater Med*. 1990; 1:233–8. doi: 10.1007/BF00701082.
- Aparecida AH, Fook MVL, Santos ML, Guastaldi AC. Influência dos íons K⁺ e Mg²⁺ na obtenção de apatitas biomiméticas. *Eclética Quím*. 2005;30(4):13–8. doi: 10.1590/S0100-46702005000400002.
- Bone HG, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, et al. Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res*. 2010;25(5):937-47. doi: 10.1359/jbmr.091035.
- Boonen S, Rosenberg E, Claessens F, Vanderschueren D, Papapoulos S. Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(1):73-9. doi: 10.1007/s11914-011-0085-9.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- Brömme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(5):585-600. doi: 10.1517/13543780902832661.
- Bruzzzone AAG, Costa HL, Lonardo PM, Lucca DA. Advances in engineered surfaces for functional performance. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*. 2008;57(2):750-69. doi: 10.1016/j.cirp.2008.09.003
- Cabal A, Jayakar RY, Sardesai S, Phillips EA, Szumiloski J, Posavec DJ, et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomography and finite element analysis of bone strength at the distal radius in ovariectomized adult rhesus monkey demonstrate efficacy of odanacatib and differentiation from alendronate. *Bone*. 2013;56(2):497-505. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.011.

Chapurlat RD, Arlot M, Burt-Pichat B, Chavassieux P, Roux JP, Portero-Muzy N, Delmas DP 2007 Frequência de microfissuras e remodelação óssea em mulheres osteoporóticas na pós-menopausa em uso prolongado de bisfosfonatos: um estudo de biópsia óssea. *J Bone Miner Res* 22:1502-1509.

Correa APL. Implantes de titânio com superfície tratada a base de β tricálcio fosfato em levantamento da membrana sinusal. Estudo experimental de superfície, análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2018.

Cusick T, Chen CM, Pennypacker BL, Pickarski M, Kimmel DB, Scott BB, et al. Odanacatib treatment increases hip bone mass and cortical thickness by preserving endocortical bone formation and stimulating periosteal bone formation in the ovariectomized adult rhesus monkey. *J Bone Miner Res*. 2012;27(3):524-37. doi: 10.1002/jbmr.1477.

Duong LT. Therapeutic inhibition of cathepsin K-reducing bone resorption while maintaining bone formation. *Bonekey Rep*. 2012;(1):67. doi: 10.1038/bonekey.2012.67.

Figueira-Júnior HC. Tratamento biomimético de discos e implantes de titânio com alendronato. caracterização topográfica, estudo histométrico e imunoistoquímico em coelhos [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2018.

Fratzl-Zelman N, Roschger P, Fisher JE, Duong LT, Klaushofer K. Effects of Odanacatib on bone mineralization density distribution in thoracic spine and femora of ovariectomized adult rhesus monkeys: a quantitative backscattered electron imaging study. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(3):261-9. doi: 10.1007/s00223-012-9673-7.

Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A, et al. Micro-topography and reactivity of implant surfaces: an in vitro study in simulated body fluid (SBF). *Microsc Microanal*. 2015;21(1):190-203. doi: 10.1017/S1431927614014615.

Khan MP, Singh AK, Singh AK, Shrivastava P, Tiwari MC, Nagar GK, et al. Odanacatib restores trabecular bone of skeletally mature female rabbits with

osteopenia but induces brittleness of cortical bone: a comparative study of the investigational drug with PTH, estrogen, and alendronate. *J Bone Miner Res.* 2016;31(3):615-29. doi: 10.1002/jbmr.2719.

Kiviranta R, Morko J, Uusitalo H, Aro HT, Vuorio E, Rantakokko J. Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. *J Bone Miner Res.* 2001;16(8):1444-52. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.8.1444.

Leung P, Pickarski M, Zhuo Y, Masarachia PJ, Duong LT. The effects of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. *Bone.* 2011;49(4):623-35. doi: 10.1016/j.bone.2011.06.014.

Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, et al. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest.* 2013;123(2):666-81. doi: 10.1172/JCI64840.

Machado ACP. Biocompatibilidade in vivo de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

Mazzo CR, Reis AC, Shimano AC, Valente ML. In vitro analysis of the influence of surface treatment of dental implants on primary stability. *Braz Oral Res.* 2012;26(4):313-17. doi: 10.1590/S1806-83242012005000006.

Mendes VC e Davies J.E. Uma nova perspectiva sobre a biologia da osseointegração. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* 2016;70(2).

Mcclung M, Langdahl B, Papapoulos S, Saag KG, Adami S, Bone HG, et al. Odanacatib anti-fracture efficacy and safety in postmenopausal women with osteoporosis. Results from the phase III long-term odanacatib fracture trial (LOFT). *J Bone Miner Res.* 2014;29(Suppl 1).

Muise ES, Podtelezhnikov AA, Pickarski M, Loboda A, Tan Y, Hu G, et al. Effects of long-term odanacatib treatment on bone gene expression in ovariectomized adult rhesus monkeys: differentiation from alendronate. *J Bone Miner Res.* 2016;31(4):839-51. doi: 10.1002/jbmr.2752.

Pennypacker B, Shea M, Liu Q, Masarachia P, Saftig P, Rodan S, et al. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice. *Bone*. 2009;44(2):199-207. doi: 10.1016/j.bone.2008.08.130.

Pennypacker BL, Duong LT, Cusick TE, Masarachia PJ, Gentile MA, Gauthier JY, et al. Cathepsin K inhibitors prevent bone loss in estrogen-deficient rabbits. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):252-62. doi: 10.1002/jbmr.223.

Peroni A, Zini A, Braga V, Colato C, Adami S, Girolomoni G. Drug-induced morphea: report of a case induced by balicatib and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(1):125-9. doi: 10.1016/j.jaad.2008.03.009.

Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia IR Jr, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(8):896-903. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02471.x.

Rünger TM, Adami S, Benhamou CL, Czerwiński E, Farrerons J, Kendler DL, et al. Morphea-like skin reactions in patients treated with the cathepsin K inhibitor balicatib. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):89-96. doi: 10.1016/j.jaad.2010.11.033.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13453-8. doi: 10.1073/pnas.95.23.13453.

Sanches NS. Avaliação da resposta óssea após instalação de implantes com a superfície tratada por raloxifeno em tíbias de ratos através da análise de microtomografia computadorizada. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2022.

_____. Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica. [TCC] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2020.

Stepan JJ, Burr DB, Pavo I, Sipos A, Michalska D, Li J, et al. Low bone mineral density is associated with bone microdamage accumulation in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone*. 2007;41(3):378-85. doi: 10.1016/j.bone.2007.04.198.

Williams DS, McCracken PJ, Purcell M, Pickarski M, Mathers PD, Savitz AT, et al. Effect of odanacatib on bone turnover markers, bone density and geometry of the spine and hip of ovariectomized monkeys: a head-to-head comparison with alendronate. *Bone*. 2013;56(2):489-96. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.008.

Yi C, Hao KY, MA T, Lin Y, Ge XY, Zhang Y. Inhibition of cathepsin K promotes osseointegration of titanium implants in ovariectomised rats. *Sci Rep*. 2017;7:446-82. doi: 10.1038/srep44682.

Younis I, Gault D, Sabbagh W, Kang NV. Patient satisfaction and aesthetic outcomes after ear reconstruction with a Branemark-type, bone-anchored, ear prosthesis: a 16 year review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(10):1650-5. doi: 10.1016/j.bjps.2009.10.004.

Yuan Y, Lee TR. Contact Angle and Wetting Properties. In: BRACCO, G. e HOLST, B. (Ed.). *Surface Science Techniques*: Springer Berlin Heidelberg. 2013; 51(1):33-4. Doi:10.1007/978-3-642-34243-1

Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 2007;28(18):2821-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.024.

Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(3):258-64. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01195.x.

ANEXO

Anexo A – Comitê de Ética no Uso Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo da resposta óssea de uma superfície de implantes revestida com odanacatib através das análises de molhabilidade, topográfica, cultura de células, histomorfométrica e microtomografia computadorizada"**, Processo FOA nº 0524-2021, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Setembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Abril de 2023.

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

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Study of bone responder of a implant surface coated with odanacatib through, topographical, culture of cells, histomorphometric and computerized microtomography"**, Protocol FOA nº 0524-2021, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 01, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 01, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
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