

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Programa de Pós-graduação em Ciências

Área de concentração em Biomateriais

Linha de Pesquisa: Bioprodutos, biomateriais e nanobiomateriais: propriedades físicas, químicas, biológicas e antimicrobianas

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA MODIFICAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA OSSEOINTEGRAÇÃO
DE IMPLANTES DENTÁRIOS EM TÍBIA DE COELHOS**

Orientador: Professor Associado Dr. Fellippo Ramos Verri

Coorientadora: Professora Associada Dra. Ana Paula Farnezi Bassi

Coorientadora: Professora Associada Dra. Ana Paula Ramos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Programa de Pós-graduação em Ciências
Área de concentração em Biomateriais
Linha de Pesquisa: Bioprodutos, biomateriais e nanobiomateriais: propriedades físicas,
químicas, biológicas e antimicrobianas

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS EM TÍBIA DE COELHOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do Campus de Araçatuba –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção
do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS
(Área de concentração em Biomateriais)

Orientador: Professor Associado Dr. Fellippo Ramos Verri
Coorientadora: Professora Associada Dra. Ana Paula Farnezi Bassi
Coorientadora: Professora Associada Dra. Ana Paula Ramos

Araçatuba – SP
2024

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e Silva, Rodrigo Capalbo da.
Estudo comparativo da modificação de superfícies de titânio na osseointegração de implantes dentários em tíbia de coelhos / Rodrigo Capalbo da Silva. – Araçatuba, 2024
43 f. : il. ; tab.

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

Orientador: Prof. Fellippo Ramos Verri

Coorientadora: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi

Coorientadora: Profa. Ana Paula Ramos

1. Implantes dentários 2. Propriedades de superfície
3. Osseointegração I. T.

Black D15

CDD 617.695

Dedico este trabalho com muito amor e carinho, à minha família, meu alicerce em tudo o que faço. O apoio de vocês foi fundamental para percorrer este caminho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, com sua infinita bondade permitiu que, durante esses anos, obstáculos na vida pessoal e profissional fossem vencidos, me capacitando, dando forças e discernimento para que continuasse. Obrigado por tudo o que o Senhor preparou para mim.

Aos **meus pais Jorge e Érica**, que mais do que eu, batalharam por essa conquista e fizeram de tudo para permitir que eu corresse atrás dos meus sonhos. Obrigado por todo o suporte, por nos momentos mais difíceis não me deixarem cair e ajudar na minha formação. Hoje se tenho uma profissão digna, foi porque vocês lutaram por isso. Vocês são a maior referência e exemplo que tenho como pessoas, tudo o que fiz e faço é por vocês. Amo vocês mais que tudo!

Ao **meu irmão Rafael**, meu exemplo de força. Tudo o que passamos nos últimos meses foi para nos fortalecer e nos aproximar. Você é meu companheiro e meu melhor amigo. Obrigado por todos os momentos que vivemos juntos, e vamos viver muito ainda sempre apoiando e fortalecendo um ao outro. Sempre estarei ao seu lado batalhando para que você seja muito feliz.

Aos **meus familiares**, por todo apoio que sempre deram a mim e minha família. Sou grato por saber que tenho uma família unida, que se faz tão presente. Obrigado por todo incentivo e por acreditarem nos meus sonhos.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, no nome do diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, que tanto faz pela população e alunos de graduação e pós-graduação que passam por esta instituição. Foram 12 anos nesta instituição na qual me orgulho muito de ter realizado a minha formação e maiores conquistas profissionais. Vivi momentos nos quais sempre carregarei comigo, fiz grandes amigos, e fui muito feliz.

Ao meu professor e orientador **Professor Doutor Fellippo Ramos Verri**, que foi fundamental para a minha formação, e é uma referência de profissional e pessoa para mim. Sou muito grato por todo conhecimento compartilhado, por sempre se mostrar disponível, por ter me guiado nos caminhos da Implantodontia por muitos anos, desde o curso de Aperfeiçoamento em 2016. Agradeço aos anos de amizade e trabalho que tivemos juntos.

Ao **Professor Doutor Eduardo Piza Pellizzer**, pelo período de convivência durante os últimos anos nos cursos, na faculdade e churrascos. O senhor é um exemplo

como ser humano para mim, que sempre mostrou um cuidado muito grande por quem está ao seu lado. Foi uma honra trabalhar ao seu lado e fico muito feliz pela disponibilidade por compor a banca deste momento tão importante.

A **Professora Doutora Aimee Maria Guiotti**, por todo o conhecimento compartilhado durante os anos, principalmente durante o período que fui aluno do Núcleo de ATM da faculdade. Sou muito grato de poder ter sido seu aluno. Agradeço a disponibilidade em compor a banca da minha defesa de tese.

Ao **Professor Doutor André Luis da Silva Fabris**, pela amizade e por muitas vezes ter me guiado no caminho da Cirurgia. Admiro a capacidade que o senhor tem de incentivar os alunos e se mostrar tão acessível. Agradeço a disponibilidade em compor a banca da minha defesa de tese.

Ao **Professor Doutor Cleidiel Araujo Lemos**, um exemplo de profissional para qualquer pós-graduando. Acompanhar o seu crescimento e as coisas que conquistou realmente nos deixa muito felizes e orgulhosos. Obrigado pelos momentos de companheirismo. É uma grande felicidade tê-lo compondo a minha banca de tese.

As minhas coorientadoras **Professora Doutora Ana Paula Ramos e Professora Doutora Ana Paula Farnezi Bassi** por serem fundamentais para realização deste trabalho.

Aos **animais que participaram desta pesquisa (*in memoriam*)**, por terem contribuído com suas vidas para o desenvolvimento da ciência.

Ao Professor Doutor Francisley Ávila Souza, pelos anos de trabalho juntos durante o período de Graduação e Mestrado, pela colaboração neste projeto, e principalmente pela amizade. Sou eternamente grato de poder ter convivido com o senhor, aprendido muito profissionalmente e como pessoa. O senhor foi a primeira pessoa a acreditar em mim, e ter me dado oportunidades. Minha eterna gratidão.

A **Hiskell Francine Fernandes e Oliveira**, por todo o companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação, empenho e trabalho foram essenciais para que este projeto fosse executado. Você é um exemplo como pessoa e profissional. Tenho certeza de que se tornará referência em sua área. Sou muito grato por tudo o que fez por mim, por ter me incentivado em todas as etapas e ter me ensinado muito. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos da pós-graduação, **João Pedro Limirio, Bruno Coelho, Lais Kawamata, Ana Carla Gonçales, Ricardo Fantasia** por se mostrarem presentes em todos os momentos. A amizade de cada um de vocês foi muito importante para que esse

período se tornasse mais leve e prazeroso. Sem você este projeto não teria sido executado.

Ao meu amigo **Henrique Hadad**, meu grande amigo e que considero um irmão. Com certeza um dos maiores presentes que a pós-graduação me deu. Me orgulho de cada conquista sua, mais do que merecida. Desde o início da nossa amizade sabia que seu futuro seria grande, e te ver crescendo cada vez mais é um grande motivo de alegria. Obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos, felizes ou de desafios. Saiba que sempre terá alguém aqui para contar.

Aos meus amigos **Marcel Eguchi, Ana Daniela Spínola, Yasmin Bantim, Carlos Umberto, Wellington Tonon, Stéfani Ferrioli, Douglas Prado, Diane Nunes, Samea Paiva, Driell Bernardi, Renato Rodrigues, Felipe Celoni, Gabriel Ávila** por serem amigos tão fiéis e não soltarem minha mão em nenhum momento. Vocês me ensinam a ser uma pessoa melhor diariamente. Obrigado por se fazerem tão presente, por proporcionarem momentos tão felizes ao seu lado. Sou muito grato por tê-los em minha vida.

A minha namorada **Ana Maira Pereira Baggio**, por diariamente me mostrar o verdadeiro significado de amor e cuidado. Por ter me apoiado no momento mais difícil da minha vida, e por trazer leveza em meio ao caos. Você me incentiva a ser melhor diariamente com os seus gestos. Admiro sua resiliência e a forma de enxergar a vida. Eu te amo.

Aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, sempre muito solícitos.

A **todos os professores que passaram pela minha vida**, ajudando a construir a minha história e grande parte de quem sou. Obrigado por acreditarem na educação, por cada palavra compartilhada dentro da sala de aula carregada de sentimentos e experiência, por mudarem a vida de um eterno aprendiz.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Associado Juliano Pelim Pessan**, por permitir o meu desenvolvimento clínico e científico com a toda sua estrutura.

Aos **funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas dos últimos 6 anos. Agradeço o trabalho e convivência com todos.

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

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Doutorado durante alguns anos do curso. Agradeço por promover o apoio financeiro que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides (DQ/FFCLRP-USP)**, os **pós-graduandos Marcos Cruz e Lucas sob supervisão da Profa. Ana Paula Ramos**, pelo desenvolvimento do tratamento de superfície e análises in vitro deste projeto.

Ao **Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas miméticos de biomembranas sob supervisão Prof. Tit. Pietro Ciancaglini (DQ- FFCLRP/USP)**, pelo auxílio de desenvolvimento neste trabalho.

Aos **pacientes que já atendi**, pela relação de confiança estabelecida, permitindo que de alguma forma pudesse contribuir para a sua saúde.

Aos **meus alunos**, por confiarem em mim e em meu trabalho. Compartilhar conhecimento com vocês é muito prazeroso, e um desafio pela responsabilidade de formar um profissional. Aprendo muito com vocês. Muito obrigado por tudo.

“O compartilhamento é um ingrediente fundamental para uma vida feliz.”

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS EM TÍBIA DE COELHOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos físico-químicos, biomecânicos e biológicos da osseointegração de implantes com superfícies de jateamento seguida do ataque ácido disponível comercialmente (SLA), superfícies modificadas por recobrimento com hidroxiapatita isolada (HA), com hidroxiapatita com adição de magnésio (MG) e com hidroxiapatita e adição de zinco (ZN) nos períodos de 2 e 4 semanas. Na análise *in vitro*, houve diferença na característica topográfica de todos os grupos experimentais. No grupo SLA, foi possível observar um maior ângulo de contato quando comparado as outras superfícies. As superfícies experimentais mostraram-se viáveis para o crescimento de células osteoblásticas. Para análise *in vivo*, 24 coelhos receberam 96 implantes cone morse de 3,5x10mm na porção medial das tíbias direita e esquerda, sendo dois implantes de cada superfície em cada tíbia. Nos períodos de 2 e 4 semanas os animais foram anestesiados e medidos o coeficiente de estabilidade e torque remoção no implante localizado mais proximal à articulação tíbio-femural. Em 4 semanas, os valores de ISQ do grupo ZN ($81 \pm 2,45$) foram estatisticamente superiores em relação ao grupo controle SLA ($68,33 \pm 10,69$). No período de 2 semanas, os valores médios de torque de remoção dos grupos HA ($50 \pm 4,62$) e ZN ($53 \pm 5,97$) foram superiores ao grupo controle SLA ($33 \pm 6,53$). No período de 4 semanas, os valores de torque do grupo ZN ($58,5 \pm 12,22$) foram superiores a SLA ($34 \pm 7,82$). A porcentagem do volume ósseo dos grupos MG ($24,6 \pm 3,82$) foi superior aos grupos SLA ($41,89 \pm 0,29$) e HA ($39,76 \pm 1,32$), no período de 2 semanas, e ZN ($16,76 \pm 0$) foi maior que SLA. A superfície óssea foi estatisticamente superior nos grupos MG ($427,5 \pm 48,35$) e ZN ($404,01 \pm 67,89$) em relação ao grupo HA ($674,52 \pm 18,80$). O número de trabéculas do grupo SLA ($5,34 \pm 0,08$) foi maior em comparação ao grupo ZN ($3,69 \pm 0,69$) em 2 semanas, no mesmo período grupo HA ($6,79 \pm 0,27$) também foi inferior em relação aos grupos MG ($4,02 \pm 0,33$) e ZN. As superfícies modificadas com recobrimento de hidroxiapatita isolada, e sua associação com íons de Mg^{2+} e Zn^{2+} se mostraram favoráveis para a osseointegração.

Palavras-chave: Implantes dentários; Propriedades de superfície; Osseointegração

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY OF TITANIUM SURFACES MODIFICATION IN OSSEOINTEGRATION OF DENTAL IMPLANTS IN RABBITS TIBIA

The aim of this study was to evaluate physicochemical, biomechanical and biological aspects of the osseointegration of implants with blast surfaces followed by commercially available acid etching (SLA), surfaces modified by coating with isolated hydroxyapatite (HA), coating with hydroxyapatite with addition of magnesium (MG) and covered with hydroxyapatite and addition of zinc (ZN) in periods of 2 and 4 weeks. In in vitro analysis, there was a difference in the topographic characteristics of all experimental groups. In the SLA group, it was possible to observe a greater contact angle when compared to other surfaces, indicating lower wettability. The experimental surfaces proved to be viable for the growth of osteoblastic cells. For in vivo analysis, 24 rabbits received 96 3.5x10mm morse taper implants in the medial portion of the right and left tibias, with two implants on each surface in each tibia. In periods of 2 and 4 weeks, the animals were anesthetized and the removal torque and stability coefficient on the proximal implant to the tibiofemoral joint were measured. Microtomographic analysis was performed on implants located distal to the tibiofemoral joint. At 4 weeks, the ISQ values of the ZN group (81 ± 2.45) were statistically higher compared to the SLA control group (68.33 ± 10.69). Over the 2-week period, the mean removal torque values of the HA (50 ± 4.62) and ZN (53 ± 5.97) groups were higher than the SLA control group (33 ± 6.53). In the 4-week period, the torque values of the ZN (58.5 ± 12.22) group were higher than SLA (34 ± 7.82). The percentage of bone volume in the MG group (24.6 ± 3.82) was higher than the SLA (41.89 ± 0.29) and HA (39.76 ± 1.32) groups, in the 2-week period, and ZN (16.76 ± 0) was higher than SLA. The bone surface was statistically higher in the MG (427.5 ± 48.35) and ZN (404.01 ± 67.89) groups compared to the HA group (674.52 ± 18.80). The number of trabeculae in the SLA group (5.34 ± 0.08) was higher compared to the ZN (3.69 ± 0.69) group in 2 weeks, in the same period the HA group (6.79 ± 0.27) was also lower in relation to the MG (4.02 ± 0.33) and ZN groups. Surfaces modified with isolated hydroxyapatite coating, and their association with Mg^{2+} and Zn^{2+} ions, proved to be favorable for osseointegration.

Key words: Dental implants; Surface properties; Osseointegration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento cirúrgico experimental. a. Retalho mucoperiosteal; b. Perfuração óssea; c. Instalação de implantes; d. Implantes instalados em tíbias; e, f. Sutura por planos.

Figura 2. Procedimento cirúrgico experimental para análise biomecânica. a. Exposição dos implantes; b. Smart peg em posição para valores de ISQ; c. Valor do ISQ no Ostell; d. Remoção do implante utilizando chave de instalação acoplada ao torquímetro; e. Valor do torque de remoção; f. Implante removido por contra torque.

Figura 3. Análise de MEV a. Superfície SLA x3.000; b. Superfície SLA x10.000; c. Superfície HA x3.000; d. Superfície HA x10.000; e. Superfície MG x3.000; f. Superfície MG x10.000; g. Superfície ZN x3.000; h. Superfície ZN x10.000.

Figura 4. Teste de molhabilidade avaliando ângulo de contato. a. Grupo SLA; b. Grupo HA; c. Grupo MG; d. Grupo ZN

Figura 5. Viabilidade celular nos períodos de 7 e 14 dias.

Figura 6. Análise biomecânica. a. Frequência de ressonância; b. Torque de remoção.

Figura 7. Imagens de micro-TC tridimensionais reconstruídas. a. Grupo SLA; b. Grupo HA; c. Grupo MG; d. Grupo ZN.

Figura 8. Parâmetros morfométricos. a. Volume ósseo; b. Porcentagem de Volume Ósseo; c. Superfície óssea; d. Número trabecular; e. Espessura trabecular; f. Separação trabecular obtida a partir de imagens de micro-TC reconstruídas tridimensionais em 2 e 4 semanas. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,5$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental. Distribuição dos grupos experimentais quanto ao número de animais, número de implantes e discos em cada período de avaliação.

Tabela 2. Angulo de contato com três líquidos de polaridades distintas.

Tabela 3. Energia livre total, dispersão e polaridade das superfícies.

SUMÁRIO

Introdução.....	15
Objetivo	17
Materiais e Métodos	17
Resultados	27
Discussão	33
Conclusão	36
Referências	37
Anexos	42

1- INTRODUÇÃO¹

As reabilitações orais através de implantes dentários são bem estabelecidas e apresentam alta taxa de sucesso clínico quando bem indicadas¹. Para isso, desde o advento da osseointegração, inúmeras pesquisas possibilitaram alterações macro e microestruturais nos implantes a fim de otimizar este processo permitindo uma maior previsibilidade nestes tratamentos^{2,3}.

A interação das células frente a superfície do implante tem papel fundamental para a sua integração ao tecido ósseo⁴. Diante disso, diferentes tipos de modificação de superfícies têm sido propostos para melhorar as propriedades físico-químicas superficiais e induzir respostas biológicas no tecido ósseo receptor, através da alteração da topografia, molhabilidade e energia superficial⁵. O aumento da rugosidade superficial, leva ao aumento da área de contato, maiores interações celulares, e consequentemente melhor estabilidade do implante e menor tempo de osseointegração⁶.

As modificações superficiais dos implantes podem ser realizadas por técnicas subtrativas, aditivas ou associação de ambas. No mercado atual, dentro das técnicas subtrativas, o jateamento seguido do ataque com substâncias ácidas é o mais comum por se tratar de uma técnica que traz um alto nível de previsibilidade para o tratamento^{7,8}. Estudos mostram que a alteração promovida por este método promove um aumento da adesão e proliferação celular, e consequentemente maior neoformação óssea⁹.

A adição de biominais sobre superfícies dos implantes de titânio como método de adição é amplamente estudada, no intuito de, através das propriedades desses minerais, criar uma superfície ativa que promova interações favoráveis com o tecido ósseo. Diferentes métodos podem ser utilizados para o recobrimento de superfícies metálicas. A técnica de spray de plasma é uma das mais empregadas e que gerou grandes expectativas para a formação de filmes finos de hidroxiapatita, entretanto foi observado que apresenta algumas desvantagens, como a necessidade do uso de altas temperaturas que podem alterar as propriedades físicas dos materiais, equipamentos caros, dificuldades na reprodutibilidade, dificuldade de adesão do filme e homogeneidade do recobrimento, podendo levar o insucesso dos implantes na osseointegração¹⁰. Outro método utilizado é o crescimento de hidroxiapatita sobre metais por meio da exposição à solução SBF (Simulated Body Fluid), que simula o pH e a composição iônica do fluido corpóreo. Este é um método biomimético, baseado no

¹ Normalizado de acordo com a revista Clinical Implant Dentistry and Related Research (Anexo B).

processo natural de biomineralização, possibilitando a precipitação de cristais de hidroxiapatita semelhantes ao processo *in vivo*^{11,12}.

Os fosfatos de cálcio são os principais biomateriais para reposição e regeneração do tecido ósseo devido a sua biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, baixa biodegradabilidade, apresentam boas propriedades osteocondutoras, e semelhança com a fase mineral do tecido ósseo¹³. Dentre eles, a hidroxiapatita é o biomaterial mais utilizado como substituto ósseo ou para o revestimento de superfície de implantes, devido ao seu composto inorgânico principal que é encontrado em vários tecidos mineralizados e características físicas e químicas favoráveis para osseointegração⁹. Estudo prévio mostrou resultados superiores de contato osso-implante e área de tecido ósseo para implantes com recobrimento com hidroxiapatita comparados a superfícies usinada e com ataque ácido¹⁴.

Para que a neoformação e mineralização óssea ocorram, a fosfatase alcalina é fundamental, sendo uma enzima expressa em altos níveis por osteoblastos, responsável pela hidrólise de ATP e geração de fosfato, precursor da hidroxiapatita *in vivo*¹⁵. Esta enzima é dependente da presença dos íons divalentes magnésio (Mg^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) para a sua expressão e ativação, sendo observada uma maior proliferação e diferenciação de células indiferenciadas^{16,17} e maior atividade da fosfatase alcalina em sua presença¹⁸. Seguindo este raciocínio, tem-se a hipótese de que liberação local destes íons presentes na superfície de implantes deve estimular enzimas osteogênicas específicas, promovendo um potencial osteoindutor nesta superfície através da diferenciação celular.

O magnésio é um composto inorgânico essencial para o tecido ósseo, atuando diretamente no seu crescimento e formação de trabéculas¹⁹. Dentre suas propriedades destacam-se sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas similares ao tecido ósseo²⁰. Sua liberação pode auxiliar nas propriedades osteoimunomodulatórias, produzindo ambiente anti-inflamatório e auxiliando na osteoindução pela sinalização de BMP-2²¹. Além disso o Mg^{2+} induz a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, fator principal utilizado para a indução da angiogênese²². Estes fatores levantam a hipótese de que a presença do magnésio pode promover a aceleração dos eventos da osseointegração.

O zinco é um metal que apresenta importante papel nutricional por ter efeitos em funções fisiológicas específicas no crescimento, gravidez, lactação e função cerebral²³. Dentre elas, esta substância pode apresentar atividades essenciais no tecido ósseo como

a ação na diferenciação celular em osteoblastos; síntese de osteocalcina; e interação com outros hormônios relacionados ao crescimento ósseo²⁴. Estudo mostra que o recobrimento de implantes dentários pode promover atividade antimicrobiana, o que poderia prevenir a infecção e consequente perda desses implantes²⁵. Outro estudo concluiu que a modificação do recobrimento silicato de cálcio com o zinco exibiu melhora do processo de osseointegração em coelhas osteoporóticas e promoveu aumento na proliferação e diferenciação osteoblástica, bem como na deposição de matriz mineralizada in vitro²⁶.

Sendo assim, sabendo das boas propriedades que a Hidroxiapatita, Magnésio e o Zinco podem oferecer localmente no tecido ósseo, avaliar o processo de osseointegração de implantes de titânio de superfície tratada com o recobrimento por HA, Mg²⁺ e Zn²⁺ faz-se relevante. Pensando nas vantagens que estes tratamentos de superfície de implante poderiam oferecer clinicamente, a aceleração e melhora do processo de osseointegração permitiriam o recebimento de cargas sobre o implante mais precocemente.

2- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos físico-químicos, biomecânicos e biológicos da osseointegração de implantes com superfícies modificadas por jateamento seguido do ataque ácido disponível comercialmente (SLA), superfícies modificadas por jateamento e ataque ácido disponível associadas ao recobrimento com hidroxiapatita isolada (HA), recobrimento com hidroxiapatita com adição de magnésio (MG) e recobrimento com hidroxiapatita e adição de zinco (ZN) nos períodos de osseointegração de 2 e 4 semanas em tíbias de coelhos.

3- MATERIAIS E MÉTODO

Preparação dos Discos e Implantes com Superfícies Modificadas

A modificação de superfície das amostras de HA, Mg²⁺, Zn²⁺ foi realizada por técnica previamente utilizada no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides (DQ/FFCLRP-USP), sob supervisão da Profa. Ana Paula Ramos. A metodologia está descrita em trabalhos recentes do grupo^{13,27}.

Para a modificação das superfícies foram utilizados 24 discos de Ti de 8mm de diâmetro x 1,5mm de altura, com o tratamento de superfície de jateamento seguido de

ataque ácido para análise *in vitro*, bem como, 96 implantes com plataforma tipo Cone Morse de 3,5 mm de diâmetro por 10mm de comprimento (DSP Biomedical, Campo Largo, Paraná, Brasil), com o mesmo tratamento de superfície, sendo estes divididos em 4 grupos, recebendo o seguinte delineamento experimental (tabela 1):

Tabela 1. Delineamento experimental. Distribuição dos grupos experimentais quanto ao número de animais, número de implantes e discos em cada período de avaliação.

Grupo	Número de animais por período	Número de implantes por período	Períodos de avaliação <i>in vivo</i>	Discos para análise <i>in vitro</i>
SLA - Jateamento seguido do ataque ácido	6	12 (2 por tíbia)	2 e 4 semanas	6
HA - Jateamento seguido do ataque ácido + recobrimento com hidroxiapatita isolada	6	12 (2 por tíbia)	2 e 4 semanas	6
MG - Jateamento seguido do ataque ácido + recobrimento com hidroxiapatita modificada com magnésio	6	12 (2 por tíbia)	2 e 4 semanas	6
ZN - Jateamento seguido do ataque ácido + recobrimento com hidroxiapatita modificada com zinco	6	12 (2 por tíbia)	2 e 4 semanas	6
TOTAL	24 animais	96 implantes	2 e 4 semanas	24 discos

Limpeza das superfícies

Os implantes e discos inicialmente foram submetidos a uma limpeza de plasma de baixa pressão com nitrogênio (Plasma Cleaner PDC – 32G, Harrick Plasma, Ithaca, Nova York, EUA) durante 3 minutos, com o objetivo de limpeza e ativação da superfície, tornando-a mais hidrofílica.

Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)

Na cuba de Langmuir (Insight-Brasil, 216 cm²) a deposição de filmes de Langmuir-Blodgett (LB) sobre as superfícies foram obtidas por isotermas π - A (pressão de superfície/área de superfície) em 25°C \pm 0,5°C. Foi distribuído 1.0 mmol L⁻¹ de lipídio dihexadecil fosfato (DHP) dissolvido em clorofórmio: metanol (3:1, v/v), sobre subfases contendo solução de 1.0 mmol L⁻¹ de CaCl₂ (Grupo HA), de CaMg₂ (grupo MG), de CaZn₂ (grupo ZN). Os íons foram incluídos na solução da subfase para promover a adesão entre as camadas fosfolipídicas de DHP nos filmes de LB e para servir como fonte primária de íons de cálcio para o crescimento mineral^{13,27}.

As monocamadas foram transferidas para a superfície dos implantes e discos por meio da imersão e emersão da monocamada de DHP. Foram realizados 2 ciclos de descida das amostras, as quais iniciaram e encerraram os ciclos mergulhadas dentro da monocamada. A pressão de deposição (pressão superficial) foi de 30mN/m⁻¹. A Velocidade da barreira foi de 0,42mm/s, e a velocidade de deposição (taxa de imersão/retirada) 0,038mm/s. Assim, sobre a superfície dos implantes foram formados os filmes hidrofílicos com 4 camadas lipídicas, ou seja, 2 bicamadas lipídicas, terminando com o grupo hidrofílico, isto é, com o grupo fosfato do DHP (fosfolipídio) exposto na camada superior.

Revestimento mineral e caracterização dos filmes

Para o revestimento das superfícies com os biominaerais, após a incorporação dos filmes LB, as amostras foram submersas em solução de CaCl₂, MgCl₂ ou ZnCl₂ por 12 horas, e depois em solução tampão KH₂PO₄/NaOH (pH 7,5) por mais 12 horas, e esse ciclo foi repetido 3 vezes consecutivas, com o objetivo de garantir a ligação de íons cálcio, magnésio e zinco às cargas negativas do fosfolipídeo nos filmes LB e aumentar a saturação local na interface.

Para o crescimento biomimético de hidroxiapatita isolada e modificada por Zn²⁺ ou Mg²⁺, as amostras com as superfícies modificadas com filmes LB foram mergulhadas em solução SBF (*Simulated Body Fluid*) a 37°C por 24 horas^{11,12}, esse procedimento confere a bioatividade da superfície, mimetizando a formação da camada da apatita em superfícies de materiais após a implantação *in vivo*. Ao final, as amostras foram submersas em água milli Q®, e secas com ar de nitrogênio.

Armazenamento e esterilização

Todos os implantes foram armazenados nos recipientes originais e os grupos foram identificados genericamente como G1, G2, G3 e G4 para haver o cegamento dos avaliadores e reduzir o risco de viés, apenas um autor (F.R.V.) teve o conhecimento da identificação das amostras. As amostras foram enviadas diretamente para a empresa comercial envolvida no estudo, à semelhança da preparação de esterilização comercial convencional.

ANÁLISE LABORATORIAL E *IN VITRO* DAS SUPERFÍCIES EXPERIMENTAIS

Análise da morfologia das superfícies modificadas

A morfologia das superfícies foi avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SuperScan SS-550, Shimadzu Corporation, Japan) (FFCLRP-USP). As amostras foram previamente recobertas com um filme fino de ouro por pulverização catódica pelo equipamento Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater (FFCLRP).

Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

Medidas de ângulo de contato (θ) para as superfícies foram obtidas com o equipamento DataPhysics Contact Angle System OCA 20 (DQ/FFCLRP). Este equipamento possui uma câmera CCD que coleta imagens da gota depositada sobre a superfície de interesse. As imagens obtidas foram tratadas por um software que automaticamente extrai a tangente e o ângulo formado entre a gota e a superfície, em intervalos de tempo pré-determinados. A energia livre de superfície foi calculada a partir dos valores de θ entre líquidos de diferentes polaridades e a superfície sólida, utilizando a equação de Owens-Wendt- Kaeble²⁸ que divide a energia superficial total em suas componentes dispersivas e polares.

Medidas de θ foram obtidas para os líquidos: água deionizada, diiodometano (Sigma-Aldrich, PA) e formamida (J. T. Baker, PA).

Cultura de osteoblastos in vitro

Este procedimento, tal como os demais envolvendo mineralização de células osteoblásticas foram desenvolvidos em colaboração com o Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas miméticos de biomembranas sob supervisão Prof. Tit. Pietro Ciancaglini (DQ- FFCLRP/USP).

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas eternizadas de linhagem murina MC3T3-E1 (American Type Culture Collection-ATCC™) que foram inicialmente cultivadas em meio essencial mínimo (α -MEM, Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% (v/v) de penicilina e estreptomicina. Após a confluência as células foram tripsinizadas, ressuspensas em α -MEM e pipetadas em placas de 24 poços contendo os discos de Ti com os recobrimentos, em uma densidade de 2×10^4 célula/poço, e posteriormente encubadas em 37°C, 5% de pressão CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio osteogênico foi produzido por ácido ascórbico e β -glicerofosfato, que são responsáveis pela diferenciação celular. O meio foi trocado de 2-3 vezes por semana. As células foram mantidas por 24 horas aderindo a superfície da placa.

A metodologia para os testes de viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) nos períodos de 7 e 14 dias. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células, como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples e confiável e produz resultados reprodutíveis. A componente chave é o corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. Soluções de MTT dissolvidas em meio ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm através de um sistema Elisa de análise de multiplaca (Freshney, 2016). Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade. Cada teste deve incluir um branco, contendo meio completo sem células.

Inicialmente, as células foram lavadas com tampão Hank's e adicionados 80 μ L da solução de MTT (5 mg/ml em Hank's) em 420 μ L de meio de cultura sem soro fetal bovino. As células foram incubadas por 4h, então retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 500 μ L de isopropanol acidificado (HCl 0,004 mol.L⁻¹) para completa solubilização do formazan formado. A viabilidade celular foi expressa como a

porcentagem da média em triplicata em comparação com o controle (poço limpo) em cada dia de cultura (100%).

ESTUDO *IN VIVO* DA OSSEOINTEGRAÇÃO DAS SUPERFÍCIES EXPERIMENTAIS

Delineamento Experimental

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, recendo o parecer de aprovado. O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines 2.0²⁹.

O cálculo amostral foi realizado através do programa SigmaPlot 12.0, sendo considerado o contato osso-implante (BIC) como desfecho primário de estudo publicado por Queiroz et al. 2017¹⁴, considerando um nível de significância de 5%, e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05, sendo necessários 6 animais por grupo. Para a realização deste trabalho foram utilizados 24 coelhos adultos, machos, variação *albinus*, com aproximadamente 5 (cinco) meses de idade, peso em torno de 3 a 4 Kg, mantidos em gaiolas unitárias, ambiente climatizado, alimentados com ração sólida (Ração Procoelho, Primor) e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

Após a randomização no site Research Randomizer (<https://www.randomizer.org/>), os animais receberam randomicamente 96 implantes sendo 2 implantes do mesmo grupo por tibia, podendo um mesmo animal receber implantes de diferentes grupos entre as tíbias (24 implantes por grupo) de plataforma cone morse de 3,5mm de diâmetro e 10 mm de comprimento (DSP Biomedical, Campo Largo, Paraná, Brasil), em osteotomia realizada na região da face medial das tíbias direitas e esquerdas após fresagem padronizada para Implantodontia com 3,0 mm de diâmetro e 10mm de profundidade.

Os animais foram enquadrados em 2 períodos de avaliação: 2 e 4 semanas, compondo 6 (seis) animais por grupo em cada período, e 12 implantes de cada superfície em cada período que foram usados nas análises biomecânica (análise de frequência por ressonância e remoção por torque reverso), e avaliação microtomográfica.

Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Núcleo de Experimentação em Coelhos (NECO) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, seguindo a metodologia conforme descrito em trabalhos prévios publicados^{14, 30}.

Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum por oito horas previamente ao procedimento cirúrgico. Realizou-se a anestesia geral por infiltração intramuscular da associação de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da anestesia local da região a ser operada com a infiltração de 0.3 ml/Kg de cloridrato de mepivacaína (Mepiadre, DFL, Rio de Janeiro, Brasil).

Acesso Cirúrgico

A tricotomia da face medial das tíbias direita e esquerda foi realizada, seguida da antisepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), associado ao PVPI tópico. O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão dermo-periosteal através de lâmina de bisturi n. 15 (Swann-Morton Limited, Reino Unido) acoplada a um cabo de bisturi n. 3 (Quinelato Qualidade, Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, Brasil) na margem anterior da tíbia, iniciada aproximadamente um centímetro abaixo da articulação tíbio-femural. Após incisão o retalho foi deslocado com descolador de molt nº9 (Quinelato Qualidade, Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, Brasil), com consequente exposição proximal da face medial da tíbia, local de eleição para a osteotomia. (Figura 1a)

Osteotomia e Instalação dos Implantes

Após a exposição da face lateral da tíbia realizou-se duas osteotomias de 3,0mm de diâmetro e 10mm de comprimento, separadas entre si por 5mm. O preparo do leito receptor do implante iniciou-se com a broca em forma de lança, para romper a cortical óssea. Em seguida, seguindo as instruções do fabricante, o preparo dos leitos foi realizado, utilizando conta ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), acoplado em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), a uma velocidade de

1200 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 1b). Os implantes foram instalados por meio de chave de inserção para conexão cone morse, montada em contra ângulo redutor 20:1 acoplado ao motor elétrico numa velocidade de 20 rpm. Dois implantes de cada superfície em cada tibia de animal foram instalados com a plataforma ficando ao nível da cortical óssea externa. Posteriormente o parafuso de cobertura para proteção da plataforma do implante foi instalado (Figura 1c,d).

Sutura

O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos. A sutura do plano muscular foi realizada com fio absorvível de Poligalactina 910 (Vicryl 5.0, Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil) (Figura e,f).

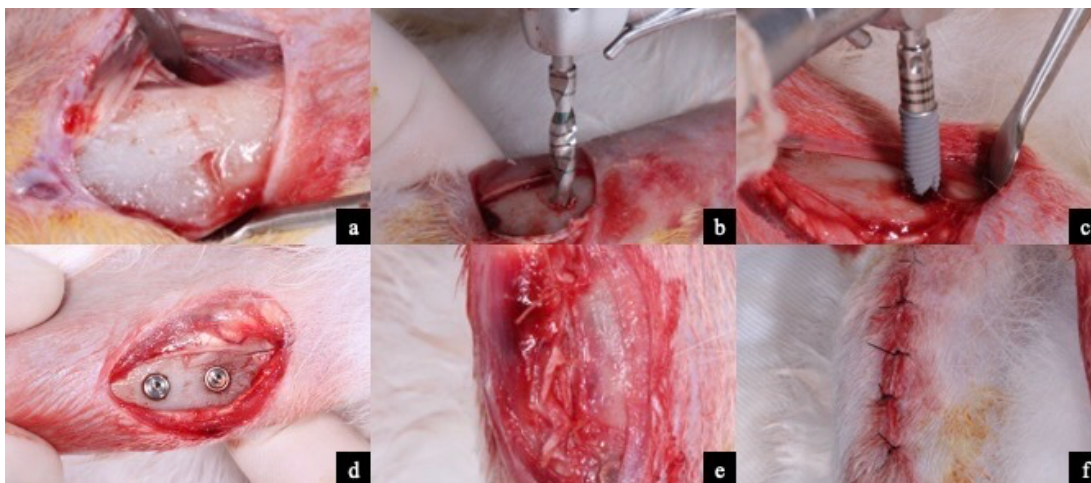


Figura 1. Procedimento cirúrgico experimental. a. Retalho mucoperiosteal; b. Perfuração óssea; c. Instalação de implantes; d. implantes instalados em tíbias; e, f. sutura por planos.

Terapêutica Medicamentosa Pós-Operatória

No pós-operatório foi administrado por via oral diluído em água 3mg/kg de Cetoprofeno (Cetoprofeno, Sanofi, São Paulo, Brasil) associado a 5mg/kg de Cloridrato de Tramadol (Cronidor, Agener União Química, São Paulo, Brasil) durante 3 dias. Também foi administrado por via intramuscular 10 mg/kg de Enrofloxacina (Enrofloxacino, Venco, Londrina, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Doxíciclina (Doxiciclina, Venco - Londrina, Brasil) durante 7 dias.

Eutanásia e Coleta do Material

Nos períodos de 2 e 4 semanas os animais agrupados em número de 12 por período, 6 por grupo experimental foram mantidos em jejum por 8 horas antes do procedimento de eutanásia. Para tal, foi realizada sedação por infiltração intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação por anestesia local nas tíbias, com a infiltração de 0.3 ml/Kg de Cloridrato de Mepivacaína (Mepiadre, DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Após o ato anestésico, foi realizada a análise biomecânica. Após análises, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos, seguido da superdosagem de tiopental sódico. Após eutanásia, as tíbias direita e esquerda foram removidas, o tecido mole excedente eliminado, e a pós-fixação foi realizada em solução de formol tamponado a 10%, durante um período de 24 horas. Os implantes localizados mais distais à articulação tíbio-femural foram avaliados pela análise microtomográfica.

IMPLANTES PROXIMAIS A ARTICULAÇÃO TIBIO-FEMURAL

Análise de Frequências por Ressonância

Após anestesia geral, acesso cirúrgico e exposição dos implantes (Figura 2a) removeu-se o parafuso de cobertura do implante, e foi instalado o smart peg do aparelho de frequência por ressonância (Ostell® Instrument, Integration Diagnostics AB, Gotemburgo, Suécia). O coeficiente de estabilidade (ISQ) do implante por meio da análise de frequência de ressonância foi medido em suas quatro faces (proximal, distal e laterais direita e esquerda) nos períodos de 2 e 4 semanas (Figura 2b,c). Os valores obtidos das quatro direções foram somados e feita a média aritmética gerando o valor médio de cada implante sendo enquadrado em um dos 4 grupos de acordo com o tratamento realizado, compondo 6 valores por cada superfície em cada período.

Análise Biomecânica (Remoção por Contra Torque)

Após a análise de frequência por ressonância, a chave de instalação foi posicionada no implante (Figura 2d), e os implantes mais próximos da articulação tíbio-

femural foram removidos por meio de um torquímetro digital (Data Tork CEM 3, Tohnichi Mfg.Co.Ltd, Tokyo, Japan), e foi mensurado em N/cm o valor necessário para a remoção do implante. Os valores dos 4 grupos compondo 6 valores por cada superfície em cada período de eutanásia (Figura 2e,f).

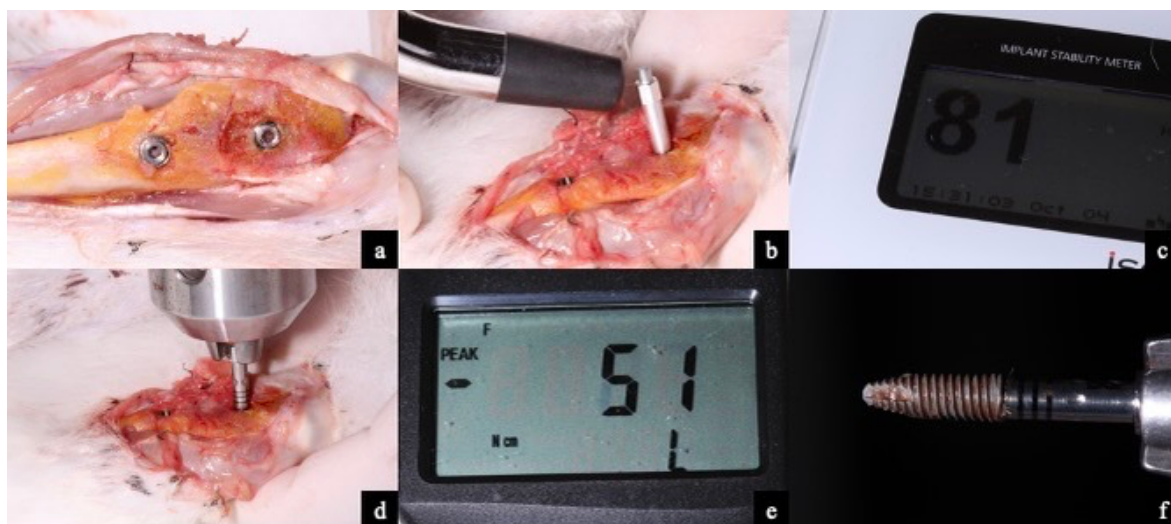


Figura 2. Procedimento cirúrgico experimental para análise biomecânica. a. Exposição dos implantes; b. Smart peg em posição para valores de ISQ; c. Valor do ISQ no Ostell; d. Remoção do implante utilizando chave de instalação acoplada ao torquímetro; e. Valor do torque de remoção; f. Implante removido por contra torque.

IMPLANTES DISTAIS A ARTICULAÇÃO TIBIO-FEMURAL

Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as peças obtidas contendo os implantes localizados mais distais a articulação tibio-femural foram fixadas em formol tamponado a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) no período de 24 horas, seguidos de lavagem em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica. A análise microtomográfica foi realizada por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) sendo definido os parâmetros ideiais para a obtenção das imagens. 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), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam

Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem variando de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas e observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foram avaliados e mensurados o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), superfície óssea (BS), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), posteriormente realizou-se a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7)³¹.

Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados no programa SigmaPlot 12.0. Para os parâmetros quantitativos obtidos das análises biomecânica (torque reverso), frequência por ressonância e microCT, foi aplicado o teste Two-way ANOVA seguido da múltipla comparação de Tukey.

4- RESULTADOS

Análise da morfologia das superfícies modificadas

A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou diferença na característica topográfica de todos os grupos experimentais. A superfície do grupo SLA apresentou superfície com rugosidade irregular, com padrão de crateras sendo possível observar picos e vales de tamanhos distintos, não havendo uma homogeneização no padrão de modificação (Figura 3a,b). O grupo HA apresentou padrão semelhante ao grupo SLA de picos e vales, entretanto é possível observar a deposição dos filmes de hidroxiapatita sobre a superfície dos discos (Figura 3c,d). Nos grupos MG e ZN é possível observar maior deposição dos filmes do recobrimento realizado, causando o preenchimento dos vales do tratamento prévio do jateamento com ataque ácido, sendo mais evidente no grupo ZN (Figura 3e,f,g,h).

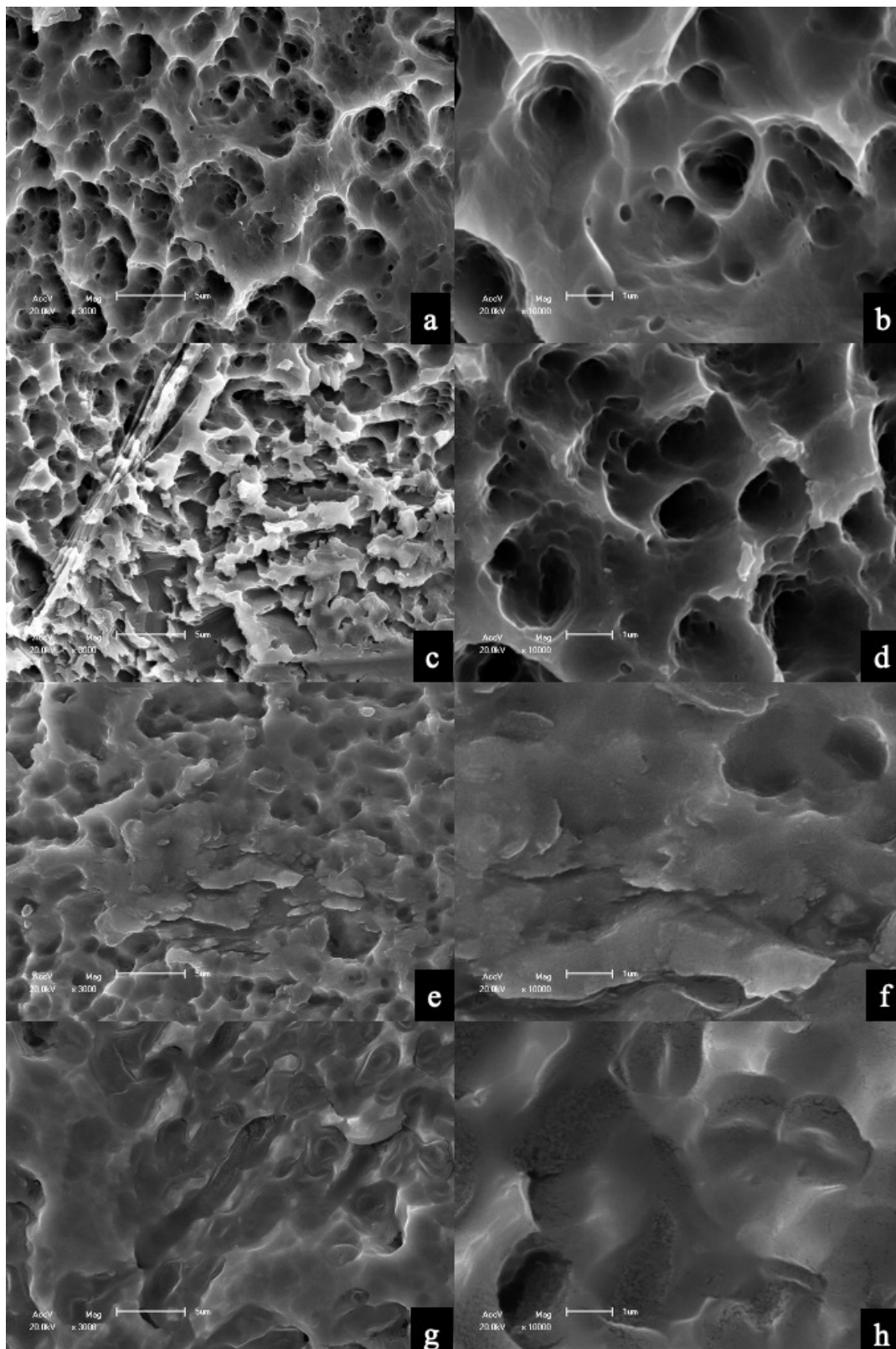


Figura 3. Análise de MEV a. Superfície SLA x3.000; b. Superfície SLA x10.000; c. Superfície HA x3.000; d. Superfície HA x10.000; e. Superfície MG x3.000; f. Superfície MG x10.000; g. Superfície ZN x3.000; h. Superfície ZN x10.000.

Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

O ângulo de contato foi medido com três líquidos de polaridades distintas: água, formamida e diiodo. No grupo SLA, é possível observar um maior ângulo de contato quando comparado as outras superfícies, indicando menor molhabilidade. Entre as três superfícies experimentais com recobrimento, a superfície do grupo ZN apresentou a menor ângulo de contato com água, mostrando maior capacidade de molhabilidade, seguido dos grupos HA e MG (Tabela 1). Foi observado maior energia livre de superfície nas três superfícies com recobrimento em relação a superfície controle, sendo maior no grupo ZN (Tabela 2).

Tabela 2. Angulo de contato com três líquidos de polaridades distintas

Ângulo de contato	Água	Formamida	Diiodo
SLA	87,2	87,85	59,2
HA	11,97	20,15	78,7
MG	16,4	8,5	61,82
ZN	10,62	9,25	73,5

Tabela 3. Energia livre total, dispersão e polaridade das superfícies

Energia livre de superfície	SETOTAL	DISPERSÃO	POLARIDADE
SLA	23.3	16.52	6.78
HA	70.37	9.04	61.33
MG	70.08	15.02	55.06
ZN	74.15	9.7	64.45

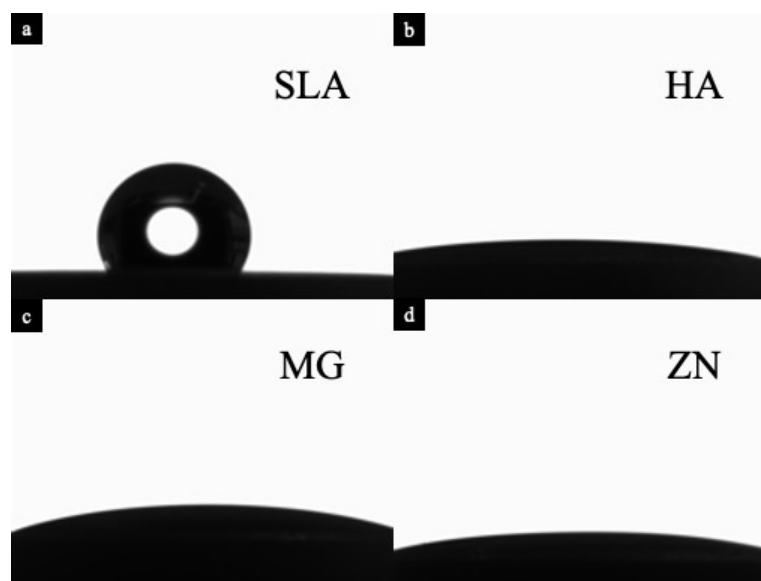


Figura 4. Teste de molhabilidade avaliando ângulo de contato. a. Grupo SLA; b. Grupo HA; c. Grupo MG; d. Grupo ZN

Cultura de osteoblastos in vitro

O teste de viabilidade celular mostrando o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, evidenciou que tanto a superfície controle (SLA), quanto as superfícies experimentais se mostraram viáveis para o crescimento de células osteoblásticas, com ausência de toxicidade (Figura 5).

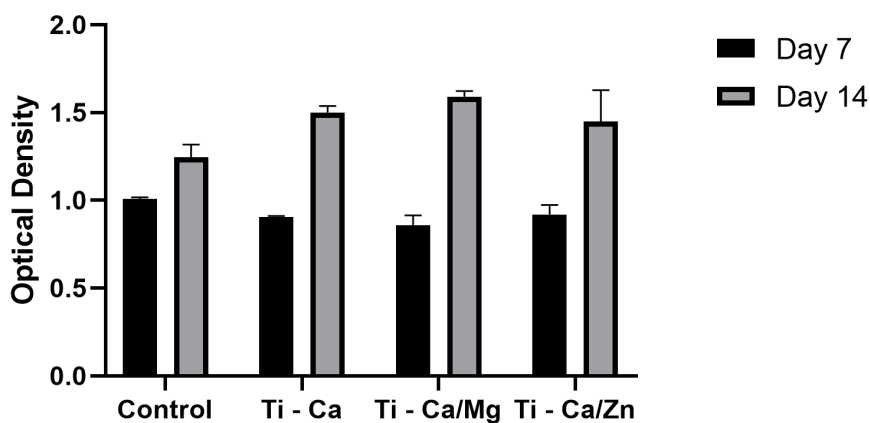
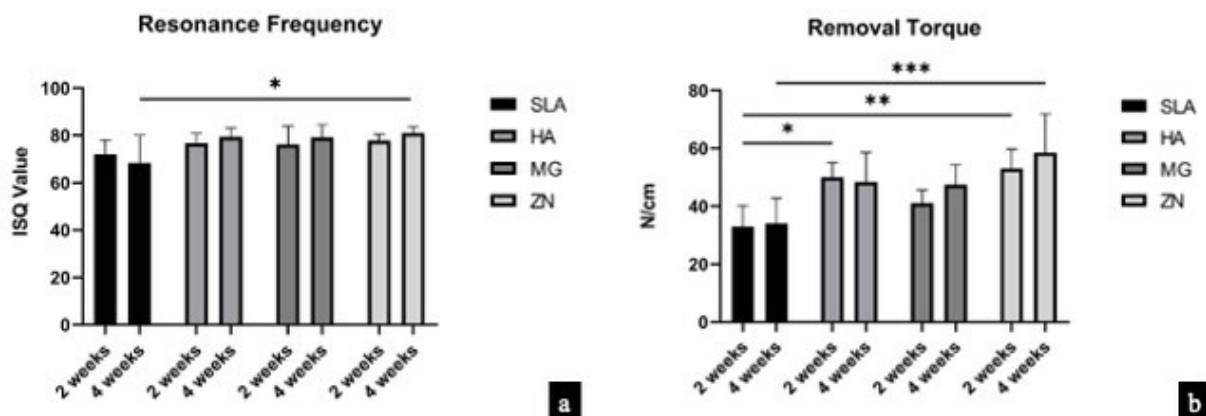


Figura 5. Viabilidade celular nos períodos de 7 e 14 dias.

Análise Frequência por Ressonância (ISQ)

Todos os implantes se mostraram estáveis, com ausência de mobilidade, sinais de infecção, traços de trincas ou fraturas ou perda óssea periimplantar. Na análise de frequência por ressonância, no período mais precoce de análise não houve diferença



estatisticamente significativa entre os grupos. No período de 4 semanas, os valores de ISQ do grupo ZN foram estatisticamente superiores em relação ao grupo controle SLA ($p= 0,0209$) (Figura 6a).

Análise Biomecânica (Remoção por Contra-Torque)

No período de análise de 2 semanas, os valores médios de torque de remoção dos grupos HA e ZN foram estatisticamente superiores ao grupo controle SLA ($p= 0,023$ e $p= 0,0073$, respectivamente). No período de 4 semanas, os valores de torque do grupo ZN foram superiores ao grupo controle ($p= 0,0006$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies experimentais em nenhum dos períodos de análise (Figura 6b).

Figura 6. Análise biomecânica. a. Frequência de ressonância; b. Torque de remoção.

Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Um contato direto entre osso e implante é observado nas reconstruções tridimensionais obtidas a partir das imagens geradas pela análise microtomográfica (Figura 7). Trabéculas ósseas se conectam da superfície do implante ao tecido ósseo cortical tanto na região cervical, quanto no ápice dos implantes nos dois períodos de avaliação. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao volume ósseo (BV) (Figura 8a). A porcentagem do volume ósseo dos grupos MG foi estatisticamente superior em comparação aos grupos SLA ($p=0,0007$) e HA ($p= 0.0001$), no período de 2 semanas, assim como o ZN apresentou-se maior em relação a SLA e MG ($p= 0,002$ e $p= 0.0001$, respectivamente) (Figura 8b). A superfície óssea foi estatisticamente superior nos grupos MG e ZN em relação ao grupo HA ($p= 0,0019$ e $p= 0,0008$). O

número de trabéculas do grupo SLA foi menor em comparação ao grupo ZN ($p=0,0252$) no período mais precoce de avaliação. No mesmo período o grupo HA também foi inferior em relação aos grupos MG e ZN ($p=0,0002$ e $p=0,0001$, respectivamente) (Figura 8c). No período mais tardio não houve diferença entre os grupos com relação ao número de trabéculas (Figura 8d). A espessura trabecular e seu espaçamento não foram afetados pelo tratamento de superfície dos implantes nos dois períodos de análise. (Figura 7e,f)

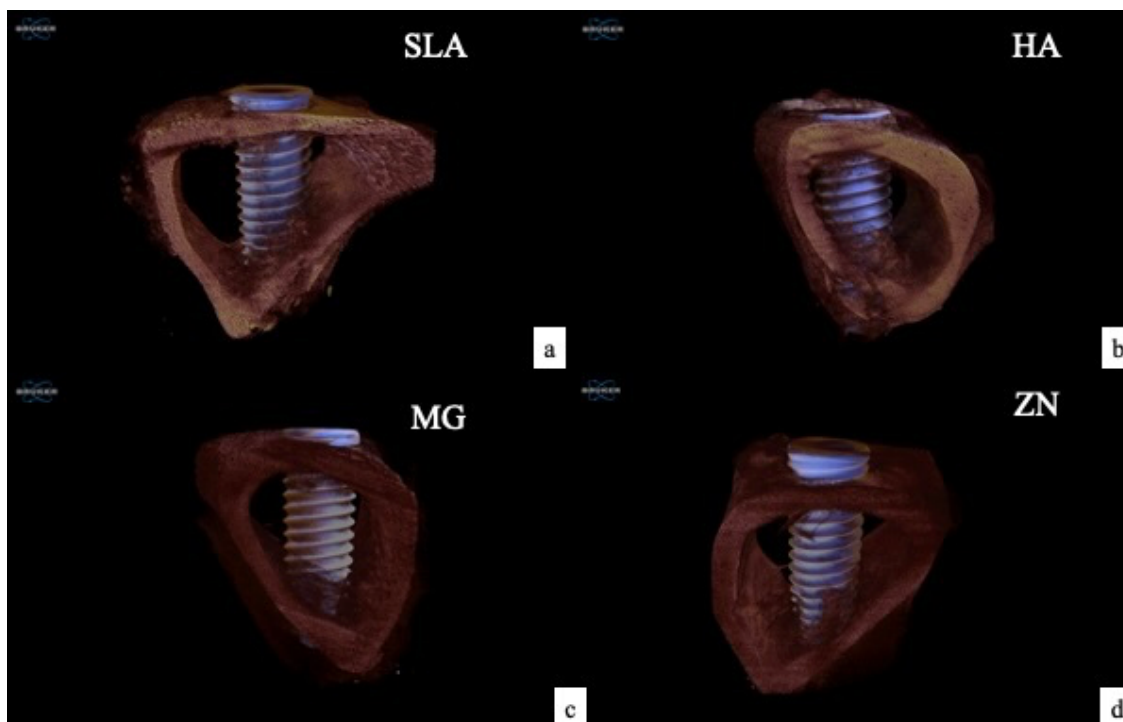


Figura 7. Imagens do micro-TC tridimensionais reconstruídas. a. Grupo SLA; b. Grupo HA; c. Grupo MG; d. Grupo ZN.

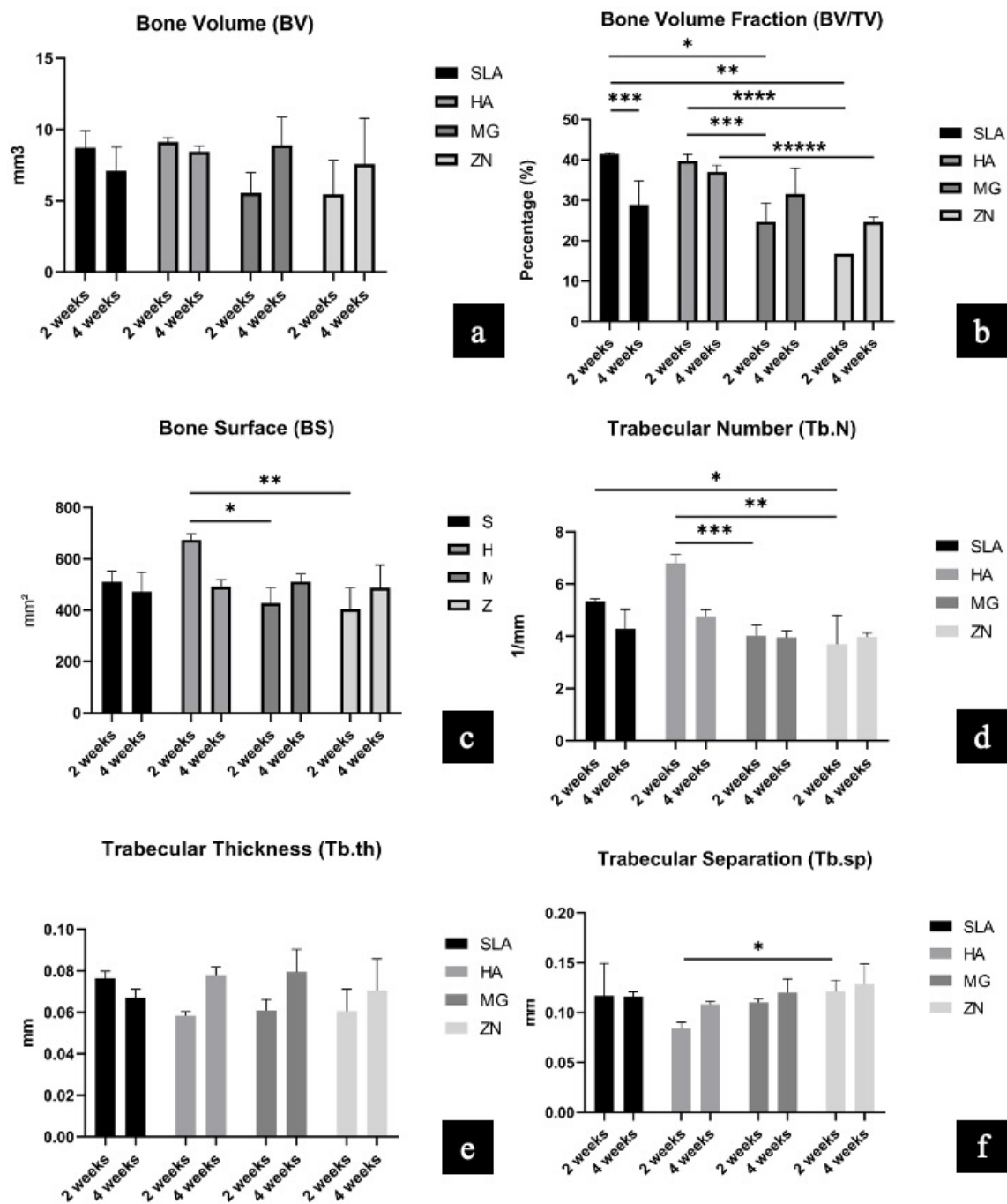


Figura 8. Parâmetros morfométricos. a. Volume ósseo; b. Porcentagem de Volume Ósseo; c. Superfície óssea; d. Número trabecular; e. Espessura trabecular; f. Separação trabecular obtida a partir de imagens de micro-TC reconstruídas tridimensionais em 2 e 4 semanas. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,5$).

5- DISCUSSÃO

A capacidade de bioatividade de um material com o tecido ósseo depende de fatores como ausência de toxicidade e ausência de resposta inflamatória exacerbada. A

hidroxiapatita sintética é um material considerado biocompatível e apresenta boa interação com o tecido ósseo quando presente no recobrimento do titânio¹³. Sua associação com os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} mostraram ausência de toxicidade às células osteoblásticas, bem como resultados físico-químicos e biomecânicos favoráveis para a osseointegração.

A modificação superficial dos implantes dentários vem sendo amplamente estudada visando uma resposta biológica mais acelerada, permitindo o carregamento de implantes de forma mais precoce. Isso porque as alterações estruturais modificam as características físico-químicas da superfície do implante, podendo melhorar a sua interação com o organismo, onde proteínas e células osteoprogenitoras podem se aderir e proliferar, otimizando o processo de osseointegração⁵.

Dentre os estudos que avaliam a osseointegração de implantes instalados em tíbias de coelhos, o período de avaliação inicial de 2 semanas foi o mais precoce encontrado na literatura atual, portanto este trabalho teve a metodologia baseada neste período inicial de avaliação. Entretanto, a correlação entre a idade de coelhos e a idade de humanos estabelece que 8 dias de vida de um coelho correspondem a 1 dia do humano³². Assim, períodos mais precoces de análise poderiam trazer mais informações a cerca deste fato e deveriam ser investigados.

A molhabilidade da superfície confere a habilidade de um fluido se espalhar sobre a superfície. Quanto mais hidrofílica a superfície, melhor é o processo de adesão, proliferação, diferenciação celular e a substituição de proteínas.³³ Outro fator ligado à molhabilidade é a energia superficial, que depende diretamente da composição química da superfície do implante, situação inflamatória, pH do meio e outros fatores³⁴. Isso pode ser correlacionado com os resultados biomecânicos superiores das superfícies experimentais, onde o contato entre osso implante é maior, sugerindo uma osseointegração otimizada nas superfícies com recobrimento de hidroxiapatita isolada e associada com os íons de Mg^{2+} e Zn^{2+} .

A superfície de jateamento e ataque ácido comercialmente disponível promove alterações superficiais no implante alterando sua rugosidade para maior adesão e proliferação celular⁸. Entretanto, durante a avaliação do ângulo de contato e energia livre de superfície no presente estudo, o grupo SLA apresentou menor energia livre de superfície e menor molhabilidade quando comparado aos grupos experimentais, entendendo que a sua interação com coágulo sanguíneo, proteínas e células osteogênicas

pode ser menor, conseqüentemente apresentar uma osseointegração mais lenta em relação as superfícies com recobrimento.

As modificações superficiais de implantes pelo recobrimento com biomateriais são promissoras, e têm apresentado resultados encorajadores. Diferentes métodos de recobrimento têm sido propostos na literatura, alguns envolvendo a incorporação de cerâmicas com altas temperaturas, podendo levar a falha mecânica dessa superfície e prejudicando a osseointegração¹⁰. O método do presente estudo é baseado na precipitação de íons, sob um ambiente que simula o fluido corpóreo, o que pode ser favorável biomecanicamente para a superfície. Isso pode ser correlacionado com o que foi encontrado no presente estudo, onde não houve a falha da osseointegração em nenhum dos implantes com tratamento por recobrimento.

Estudo avaliou o coeficiente de estabilidade de implantes com recobrimento de magnésio comparado a implantes com a superfície modificada por jateamento, instalados em tíbias de coelhos, e foi observado diferença estatisticamente significativa superiores para o grupo com recobrimento de Mg^{2+} ³⁵. Outro estudo mostrou características imunohistoquímicas e histológicas superiores da superfície recoberta com magnésio quando comparada à superfície usinada no mesmo período³⁶. Entretanto, no presente estudo o grupo MG não apresentou dados estatisticamente superiores ao grupo experimental nas análises biomecânicas.

Estudo prévio mostrou atividade osteoblástica, boa biocompatibilidade, e deposição de minerais superiores em cilindros de Mg^{2+} implantados em tíbias de coelhos, mostrando uma neoformação óssea proporcional a liberação do material no organismo³⁷. Os achados corroboram com a análise microtomográfica do presente estudo, onde o grupo da associação de hidroxiapatita com magnésio foi superior aos grupos de jateamento com ataque ácido e hidroxiapatita isolada quanto a porcentagem de volume ósseo, superfície óssea e número de trabéculas.

Estudo experimental para o fechamento de defeitos em calota de coelhos mostrou que o biomaterial com associação de zinco e hidroxiapatita obteve melhores respostas quanto a neoformação óssea comparado ao biomaterial de hidroxiapatita de forma isolada³⁸. Isso corrobora com o que foi encontrado no presente estudo, onde os parâmetros morfométricos na análise microtomográfica de superfície óssea foi estatisticamente superior nos grupos de recobrimento com a associação da hidroxiapatita com zinco e magnésio, em relação ao grupo recoberto pela hidroxiapatita isolada.

A administração sistêmica de compostos de zinco mostra efeitos positivos sobre o tecido ósseo, tanto na estimulação da formação óssea, quanto na prevenção da perda óssea, gerando expectativa na terapia e prevenção contra a osteoporose^{39,40}. Isso pode explicar o que foi encontrado no presente estudo, onde a associação da hidroxiapatita com o zinco se mostrou favorável nos aspectos físico-químicos, biomecânicos e para neoformação óssea quando comparada às outras superfícies. Clinicamente, essa superfície se mostra promissora não apenas na possibilidade de um carregamento precoce do implante, mas também em situações em que o paciente pode apresentar uma limitação da resposta osteogênica, necessitando de estudos específicos futuros.

6- CONCLUSÃO

As superfícies modificadas com recobrimento de hidroxiapatita isolada, e sua associação com íons de Mg^{2+} e Zn^{2+} se mostraram favoráveis para a osseointegração de implantes nos aspectos físico-químicos e biológicos, obtendo resultados superiores à superfície de jateamento seguido do ataque ácido. Dentre as superfícies experimentais a hidroxiapatita modificada com zinco apresentou resultados mais promissores nos parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

1. Park JC, Baek WS, Choi SH, Cho KS, Jung UW. Long-term outcomes of dental implants placed in elderly patients: a retrospective clinical and radiographic analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(2):186-191. doi:10.1111/clr.12780
2. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lindström J, Rockler B. An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984;42(8):497-505. doi:10.1016/0278-2391(84)90008-9
3. Albrektsson T, Eriksson AR, Jacobsson M, Kälebo P, Strid KG, Tjellström A. Bone repair in implant models: a review with emphasis on the harvest chamber for bone regeneration studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989;4(1):45-54.
4. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1(3):234-242. doi:10.1016/j.jmbbm.2007.12.002
5. Rosales-Leal J.I., Rodríguez-Valverde M.A., Mazzaglia G., Ramón-Torregrosa P.J., Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2010;365(1–3):222–9
6. Coelho PG, Suzuki M, Marin C, et al. Osseointegration of Plateau Root Form Implants: Unique Healing Pathway Leading to Haversian-Like Long-Term Morphology. *Adv Exp Med Biol.* 2015;881:111-128. doi:10.1007/978-3-319-22345-2_7
7. Verardi S, Swoboda J, Rebaudi F, Rebaudi A. Osteointegration of Tissue-Level Implants With Very Low Insertion Torque in Soft Bone: A Clinical Study on SLA Surface Treatment. *Implant Dent.* 2018;27(1):5-9. doi:10.1097/ID.0000000000000714
8. Velasco-Ortega E, Jimenez-Guerra A, Monsalve-Guil L, et al. Long-Term Clinical Outcomes of Treatment with Dental Implants with Acid Etched Surface. *Materials (Basel).* 2020;13(7):1553. Published 2020 Mar 27. doi:10.3390/ma13071553
9. Łukaszewska-Kuska M, Krawczyk P, Martyła A, Hędzerek W, Dorocka-Bobkowska B. Hydroxyapatite coating on titanium endosseous implants for

- improved osseointegration: Physical and chemical considerations. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(8):1055-1059. doi:10.17219/acem/69084
10. Surmenev RA, Ryabtseva MA, Shesterikov EV, Pichugin VF, Peitsch T, Epple M. The release of nickel from nickel-titanium (NiTi) is strongly reduced by a sub-micrometer thin layer of calcium phosphate deposited by rf-magnetron sputtering. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(4):1233-1239. doi:10.1007/s10856-010-3989-5
 11. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.* 1990;24(6):721-734. doi:10.1002/jbm.820240607
 12. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials.* 2006;27(15):2907-2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
 13. Cruz, Marcos Antônio E., and Ana P. Ramos. Bioactive CaCO₃/poly (acrylic acid)/chitosan hybrid coatings deposited on titanium. *Surface and Coatings Technology.* 2016; 294: 145-152.
 14. Queiroz TP, de Molon RS, Souza FÁ, et al. In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clin Oral Investig.* 2017;21(2):685-699. doi:10.1007/s00784-016-1936-7
 15. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev.* 1994;15(4):439-461. doi:10.1210/edrv-15-4-439
 16. Leem YH, Lee KS, Kim JH, Seok HK, Chang JS, Lee DH. Magnesium ions facilitate integrin alpha 2- and alpha 3-mediated proliferation and enhance alkaline phosphatase expression and activity in hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10):E527-E536. doi:10.1002/term.1861
 17. Liu YJ, Su WT, Chen PH. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *J Biomater Appl.* 2018;32(6):765-774. doi:10.1177/0885328217740730
 18. Yamaguchi M, Yamaguchi R. Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(5):773-777. doi:10.1016/0006-2952(86)90245-5

19. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A, Mills BG. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(1):32-41. doi:10.1007/s00223-001-1091-1
20. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials.* 2006;27(9):1728-1734. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.003
21. Zhang X, Chen Q, Mao X. Magnesium Enhances Osteogenesis of BMSCs by Tuning Osteoimmunomodulation. *Biomed Res Int.* 2019;2019:7908205. Published 2019 Nov 14. doi:10.1155/2019/7908205
22. Maier JA, Bernardini D, Rayssiguier Y, Mazur A. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1689(1):6-12. doi:10.1016/j.bbadis.2004.02.004
23. Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Lysionek AE, Caro RA, Weill R, Boccio JR. The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition.* 2002;18(6):510-519. doi:10.1016/s0899-9007(01)00812-7
24. Brandão-Neto J, Stefan V, Mendonça BB, Bloise W, Castro AV. The essential role of zinc in growth. *Nutr Res,* 1995; 15:335.
25. Abdulkareem EH, Memarzadeh K, Allaker RP, Huang J, Pratten J, Spratt D. Anti-biofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials. *J Dent.* 2015;43(12):1462-1469. doi:10.1016/j.jdent.2015.10.010
26. Yu J, Xu L, Li K, et al. Zinc-modified Calcium Silicate Coatings Promote Osteogenic Differentiation through TGF- β /Smad Pathway and Osseointegration in Osteopenic Rabbits. *Sci Rep.* 2017;7(1):3440. Published 2017 Jun 13. doi:10.1038/s41598-017-03661-5
27. de Souza ID, Cruz MA, de Faria AN, Zancanela DC, Simao AM, P. Ciancaglini P, Ramos AP. Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate-LB film as template. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;118:31-40.
28. Owens DK & Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13: 1741–1747.
29. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410. Published 2020 Jul 14. doi:10.1371/journal.pbio.3000410

30. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(8):896-903. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02471.x
31. Freitas GP, Lopes HB, Martins-Neto EC, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of Surface Nanotopography on Bone Response to Titanium Implant. *J Oral Implantol.* 2016;42(3):240-247. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00254
32. Dutta S, Sengupta P. Rabbits and men: relating their ages. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2018;29(5):427-435. doi:10.1515/jbcpp-2018-0002
33. Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, et al. Integrin alpha2beta1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(41):15767-15772. doi:10.1073/pnas.0805420105
34. Clark AE, Hench LL, Paschall HA. The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection. *J Biomed Mater Res.* 1976;10(2):161-174. doi:10.1002/jbm.820100202
35. Gehrke SA, Maté Sánchez de Val JE, Fernández Domínguez M, de Aza Moya PN, Gómez Moreno G, Calvo Guirado JL. Effects on the osseointegration of titanium implants incorporating calcium-magnesium: a resonance frequency and histomorphometric analysis in rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(7):785-791. doi:10.1111/clr.12909
36. Galli S, Naito Y, Karlsson J, et al. Local release of magnesium from mesoporous TiO₂ coatings stimulates the peri-implant expression of osteogenic markers and improves osteoconductivity in vivo. *Acta Biomater.* 2014;10(12):5193-5201. doi:10.1016/j.actbio.2014.08.011
37. Janning C, Willbold E, Vogt C, et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater.* 2010;6(5):1861-1868. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.037
38. Suruagy AA, Alves AT, Sartoretto SC, Calasans-Maia JA, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Physico-chemical and Histomorphometric Evaluation of Zinc-containing Hydroxyapatite in Rabbits Calvaria. *Braz Dent J.* 2016;27(6):717-726. doi:10.1590/0103-6440201601028

39. Yamaguchi M. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2010;338(1-2):241-254. doi:10.1007/s11010-009-0358-0
40. Yamaguchi M. Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2012;366(1-2):201-221. doi:10.1007/s11010-012-1298-7

ANEXOS

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



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 comparativo da modificação de superfícies de titânio na osseointegração de implantes dentários em tíbias de coelhos**", Processo FOA nº 0179-2022, sob responsabilidade de Fellippo Ramos Verri apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 28 de Março de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Janeiro de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Fevereiro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Comparative study of titanium surfaces modification in osseointegration of dental implants in rabbits tibia**", Protocol FOA nº 0179-2022, under the supervision of Fellippo Ramos Verri presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 28, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 10, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 10, 2024.

Prof. Dr. 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

ANEXO B – AUTHOR GUIDELINES

<https://www.onlinelibrary.wiley.com/page/journal/17088208/homepage/forauthors.html>