



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Pio Moerbeck da Costa Filho

**Avaliação da osseointegração de implantes de titânio com tratamento de
superfície e associação com estrôncio: estudo em ratos**

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Pio Moerbeck da Costa Filho

**Avaliação da osseointegração de implantes de titânio com tratamento de
superfície e associação com estrôncio: estudo em ratos**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Coorientadores:

Dra. Camila Chierici Marcantonio

Dr. Diego Pedreira de Oliveira

Araraquara

2023

Costa Filho, Pio Moerbeck da

Avaliação da osseointegração de implantes de titânio com tratamento de superfície e associação com estrôncio: estudo em ratos / Pio Moerbeck da Costa Filho. -- Araraquara, 2023
62 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Coorientadora: Camila Chierici Marcantonio

Coorientador: Diego Pedreira de Oliveira

1. Titânio 2. Implantes dentários 3. Propriedades de superfície 4. Osseointegração. 5. Estrôncio. I. Título

Pio Moerbeck da Costa Filho

Avaliação da osseointegração de implantes de titânio com tratamento de superfície e associação com estrôncio: estudo em ratos

Comissão Julgadora para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração em Implantodontia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Presidente e Orientador: Prof Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

3º Examinador: Prof. Dr. Rogério Margonar

4º Examinador: Prof. Dr. Rubens Moreno de Freitas

Suplente: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Suplente: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara 27 de setembro de 2023

DADOS CURRICULARES

Pio Moerbeck da Costa Filho

NASCIMENTO: 14/02/1986 BELÉM-PARÁ

FILIAÇÃO: Profa. Dra. Maria Conceição Oliveira Costa
Prof. Dr. Pio Moerbeck da Costa (*In memoriam*)

Graduação em Odontologia – 2006/2011:
Faculdade de Ciências Agrárias e da Saúde/UNIFAS

Especialização em Implantodontia – 2012/2015
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, SSA

Mestrado em Odontologia – área de Implantodontia 2016/2019
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/ Universidade Federal Fluminense (UFF)

Especialização em Gestão em Saúde – 2019/2020
Hospital Israelita Albert Einstein, SP

Master of Business Administration (MBA) em Liderança, Inovação e Gestão – 2019/2020
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS

Master of Business Administration (MBA) em Gestão, Inovação e Serviços de Saúde 2022/2023
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS

Doutorado Sanduíche em Implantodontia - 2022
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Alemanha

Agradecimentos Especiais

A Deus por ter me dado a dádiva da vida e sabedoria para seguir os tropeços e vitórias da vida.

Aos meus pais, exemplos de grandes professores, ícones em suas respectivas áreas, me proporcionaram além do DNA do ENSINO, fundamentos e princípios de um professor, com destaque: ao compromisso em ajudar ao próximo. Da mesma forma, possibilitaram uma formação médica e acadêmica pautada em princípios éticos.

A minha princesa **Louise** e nossa linda história, que esteve comigo nos melhores dias de minha vida, e principalmente nos piores.

Aos meus sogros, **Dr. Luis** e **Dra. Keyla**, que são como pais, seres humanos singulares.

Ao meu querido orientador, **Prof Dr. Joni Cirelli**, pelos seus ensinamentos e oportunidades, você é um grande exemplo para mim de professor e pesquisador, espero que além de construirmos uma ótima relação profissional, possamos construir uma relação pessoal.

Ao meu primeiro mestre na implantodontia **Prof. Dr. Maurício Barreto**, pelos ensinamentos, direcionamento profissional e oportunidades.

A querida **Profa Dra. Mônica Calasans**, pelo grande exemplo de pesquisadora e oportunidades.

A todos professores do PPG em Odontologia da UNESP-Araraquara, e em especial aos professores: **Élcio, Adriana, Daniela, José Maurício, Luis Geraldo, Morgana, Paulo Cerri, José Paschoal, Mônica, José Maurício e Lígia Pinelli**.

Aos professores José Maurício e Lígia Pinelli pelo acolhimento e ensinamentos na disciplina de Prótese Fixa na UNESP.

Aos alunos da disciplina de Implantodontia da EBMSP, pelo acolhimento e convivência desde 2008, afinal foram 16 turmas de participação em atividades, através do convite dos **Profs. Maurício e Morbeck**. Essas experiências contribuíram com o percurso profissional e acadêmico.

A Profa. Dra. Andressa e ao Prof. Dr. James Deschner da Johannes Gutenberg-Universität Mainz pela recepção na universidade e oportunidade durante doutorado sanduíche na Alemanha.

Aos colegas de curso e de projeto: **Camila, Júlio, Letícia, Rafael Molon, Maria Eduarda, Lorena, Ricardo e Carlos**.

Aos professores que tive durante minha trajetória de graduação, **especialização, mestrado e doutorado** pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Diego Pedreira de Oliveira, responsável técnico da **Empresa Extremus Smart Surface**, pela parceria no desenvolvimento desta pesquisa e tratamentos das superfícies dos implantes.

Aos familiares e amigos, apoio e incentivo, em especial ao meus amigo-irmãos **Vinícius e Antônio**

Agradeço a banca por dispor do seu precioso tempo para aprimorar o presente estudo.

Aos Funcionários, colaboradores da UNESP-Araraquara da graduação e da pós-graduação.

Aos animais que doaram a vida em prol da ciência.

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Araraquara**, em nome do **Exmo. Reitor Pasqual Barretti** e do **Exmo. Diretor da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Edson Alves Campos**, pela acolhida nesses anos de doutorado, onde sempre terei boas lembranças de onde vivi importantes anos da minha formação profissional.

Ao **PPG Odontologia da UNESP-Araraquara** em nome do Exmo. Coordenador do Programa **Prof. Dr. Paulo Cerri**, por oportunizar a todos os alunos uma estrutura de primeira para o desenvolvimento de projetos científicos e ensino de excelência, é um privilégio ser aluno de um programa CAPES 7.

A **Johannes Gutenberg-Universität Mainz**, onde realizei doutorado sanduíche e pude ampliar meus conhecimentos científicos.

A **CAPES**: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço também pelo apoio financeiro como bolsista no Doutorado (Processo 88887.497412/2020-00) e ao **PROBRAL CAPES/DAAD-Alemanha** (Processos 88887.687607.2022-00 e 88881.144012/2017-01) por ter oportunizado o doutorado sanduíche na Alemanha.

Ao **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, e à empresa Implalife Biotecnologia, Araçatuba-SP pela doação dos implantes dentários.

Os rios não bebem sua própria água; as árvores não comem seus próprios frutos. O sol não brilha para si mesmo; e as flores não espalham sua fragrância para si.

Até as obras de Deus da natureza possuem objetivos, não se apavore, nem desanime pois o senhor estará em todo caminho que traçar”

Adaptado do Papa Francisco

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E

GLOSSÁRIO

Ad libitum – à vontade

ALPL1 – Fosfatase Alcalina

BA – Bone área (Área óssea)

BIC – Bone implant contact (Contato osso implante)

Bglap – Osteocalcina

Bsp – sialoproteína óssea

BV – Volume de tecido ósseo

BV/TV – Fração de volume ósseo

Ca - Cálcio

Ca²⁺ - Cálcio

CaP – Fosfato de Cálcio

CD36 – glicoproteína plaquetária

Col1a1 – Colágeno tipo 1

GAPDH – Gliceraldeído 2 fosfato desidogrenase

HA – Hidroxiapatita

HF – Ácido fluorídrico

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MN – Micro-Nano

MNSr – Micro-Nano com Estrôncio

MNSr+ - Micro-Nano com Estrôncio em maior quantidade

NaOH – Hidróxido de sódio

OPN - Osteopontina

P - Fósforo

RT-qPCR – Reação de cadeia de polimerase em tempo real

RUNX2 - Fator de transcrição relacionado a Runt 2

Sa - Média aritmética da rugosidade da superfície medida em três dimensões sobre um plano

SPP1 - Osteopontina

Sr - Estrôncio

Sr²⁺ - Estrôncio

Tb.Th – Espessura das trabéculas

Tb.N – Número de trabéculas

Tb.Sp – Separação de trabéculas

Ti - Titânio

Ticp – Titânio comercialmente puro

TPS - pulverização de plasma de titânio

U – Usinado

uL – Micro litro

µm - Micrometro

µA - Micro Ampére

Costa Filho PM. Avaliação da osseointegração de implantes de titânio com tratamento de superfície e associação com estrôncio: estudo em ratos [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A reabilitação oral com implantes dentários visa devolver a capacidade funcional de mastigação e estética do paciente. Atualmente, os avanços técnicos, científicos e industriais, tem auxiliado a ciência da bioengenharia na busca por implantes que diminuam o intervalo de osseointegração visando reabilitar perdas dentárias causadas por atrofia pós-extração dentária, neoplasias, traumas e doenças periodontais. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vivo*, em tíbias de ratos, os efeitos do tratamento de superfície, associado à adição de estrôncio (Sr^{2+}), na osseointegração de implantes de titânio comercialmente puros (Ticp). Foram utilizadas tíbias bilaterais de 64 ratos (Holtzman), divididos em quatro grupos experimentais: Ticp usinado – Controle (U) (n=16), (MN) tratamento micro nano (n=16), tratamento micro e nano com adição de Sr^{2+} (MNSr) (n=16), e tratamento micro nano com maior adição de Sr^{2+} (MNSr+) (n=16). Os animais foram divididos em dois períodos experimentais (n=8): 15 (quinze) e 45 (quarenta e cinco) dias, após os quais foram eutanasiados. As tíbias foram removidas e alocadas para diferentes análises: tíbia direita (análise tomográfica por Micro-CT e histométrica – sistema EXAKT) e tíbia esquerda (análise do torque de remoção e expressão gênica por RT-qPCR). Os resultados do torque de remoção evidenciaram uma maior osseointegração nos períodos tardios e nas superfícies tratadas (MN, MNSr e MNSr+). A análise óssea por Micro-CT demonstrou que, na área cortical, as superfícies tratadas com estrôncio, promoveram aumento da formação óssea e redução dos espaços entre as trabéculas. Perante a análise histométrica, no osso cortical houve maior BIC nos grupos MN (15 dias) e MNSr (45 dias) quando comparados ao controle. No entanto, a análise de expressão gênica de marcadores de atividade osteogênica não apresentou diferença estatística entre os grupos, no período de 15 dias. Em estudo complementar de 7 dias *in vitro*, os pré-osteoblastos de camundongos (MC3T3-E1) foram semeadas sobre discos de Ti com os mesmos tratamentos de superfície e analisadas quanto à expressão gênica e produção de marcadores de diferenciação e atividade osteoblástica, respectivamente, por RT-qPCR e ELISA. Em ambas as análises observou-se maior expressão e síntese proteica de BMP2 e osteopontina em células semeadas sobre as superfícies MNSr e MNSr+. Os resultados sugerem que as novas superfícies tratadas pelo tratamento de superfície com adição do estrôncio são promissoras e superiores à superfície usinada em algumas análises. Porém, nas condições estudadas, foram similares entre si ($p > 0.05$). Assim, esta pesquisa aponta a necessidade de continuidade e avanço de estudos translacionais, visando melhor esclarecer os benefícios clínicos das superfícies estudadas à implantodontia.

Palavras – chave: Titânio. Implantes dentários. Propriedades de superfície. Osseointegração. Estrôncio.

Costa Filho PM. Evaluation of osseointegration of titanium implants with surface treatment and association with strontium: study in rats [tese de doutorado]. Araraquara: Faculty of Dentistry, UNESP; 2023.

ABSTRACT

Oral rehabilitation with dental implants aims to restore the patient's functional chewing and aesthetic capacity. Currently, technical, scientific and industrial advances have helped the science of bioengineering in the search for implants that reduce the osseointegration interval in order to rehabilitate tooth loss caused by post-extraction tooth atrophy, neoplasms, trauma and periodontal diseases. In this sense, the aim of the present study was to evaluate in vivo, in rat tibias, the effects of surface treatment, associated with the addition of strontium (Sr^{2+}), on the osseointegration of commercially pure titanium implants (Ticp). Bilateral tibias of 64 rats (Holtzman) were used, divided into four experimental groups: Machined Ticp – Control (U) (n=16), (MN) micro nano treatment (n=16), micro nano treatment with addition of Sr^{2+} (MNSr) (n=16), and micro nano treatment with higher addition of Sr^{2+} (MNSr+) (n=16). The animals were divided into two experimental periods (n=8): 15 (fifteen) and 45 (forty-five) days, after which they were euthanized. The tibiae were removed and allocated for different analyses: right tibia (tomographic analysis by Micro-CT and histometric analysis – EXAKT system) and left tibia (analysis of removal torque and gene expression by RT-qPCR). The results of the removal torque showed greater osseointegration in the later periods and on the treated surfaces (MN, MNSr and MNSr+). Bone analysis by Micro-CT showed that, in the cortical area, surfaces treated with strontium promoted increased bone formation and reduced spaces between trabeculae. Before the histometric analysis, in the cortical bone there was a higher BIC in the MN (15 days) and MNSr (45 days) groups when compared to the control. However, the analysis of gene expression of markers of osteogenic activity showed no statistical difference between the groups, in the period of 15 days. In a complementary in vitro study, mouse pre-osteoblasts (MC3T3-E1) were seeded on Ti discs with the same surface treatments and analyzed for gene expression and production of differentiation markers and osteoblastic activity, respectively, by RT-qPCR and ELISA. In both analyzes, a higher expression and protein synthesis of BMP2 and osteopontin was observed in cells seeded on the MNSr and MNSr+ surfaces. The results suggest that the new surfaces treated by the surface treatment with the addition of strontium are promising and superior to the machined surface in some analyses. However, under the studied conditions, they were similar to each other ($p > 0.05$). Thus, this research points to the need for continuity and advancement of translational studies, aiming to better clarify the clinical benefits of the surfaces studied in implant dentistry.

Keywords: Titanium. Dental implants. Surface properties. Osseointegration. Strontium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Tecido Ósseo e Osseointegração	15
3.2 Superfícies dos Implantes e Osseointegração	15
3.3 Tratamentos de Superfície dos Implantes.....	16
3.3.1 Tratamento de superfície por métodos ácidos	18
3.3.2 Tratamento de superfície por métodos alcalinos	18
3.3.3 Tratamento de superfície com metais	19
3.3.4 Tratamento de superfície com adição de estrôncio	19
3.3.5 Combinação de tratamento químico e adição de estrôncio na superfície de implantes	21
4 MATERIAL E MÉTODO	23
4.1 Confecção dos Implantes	23
4.2 Grupos Experimentais.....	23
4.3 Desenho Experimental	24
4.4 Procedimento de Cirurgia e Eutanásia	26
4.4.1 Instalação dos implantes.....	26
4.4.2 Eutanásia e obtenção das amostras.....	28
4.5 Análises <i>In Vivo</i>: Processamento das Amostras e Análises.....	29
4.5.1 Avaliação do torque de remoção dos implantes.....	29
4.5.2 Avaliação da expressão gênica no osso alveolar (RT-qPCR).....	29
4.5.3 Análise por Micro-CT.....	30
4.5.4 Avaliação histomorfométrica através do sistema EXAKT....	31
4.5.5 Análise estatística.....	34
4.6 Análises <i>In Vitro</i> Complementar.....	34
4.6.1 Cultura de células.....	34
4.6.2 Expressão gênica de marcadores ósseos por RT-qPCR.....	35
4.6.3 Produção proteica de marcadores ósseos por ELISA.....	35
5 RESULTADOS	37
5.2 Análise Óssea por Micro-CT.....	38
5.2.1 Osso cortical.....	38
5.2.2 Espaço medular.....	40
5.3 Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR	43

5.4 Análise Histomorfométrica pelo Sistema EXAKT	43
5.5 Análise Complementar <i>In Vitro</i> : Expressão Gênica eProdução de Proteínas – RT-qPCR e Elisa	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	62

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Academia Europeia de Periodontia, um implante dentário pode ser considerado como sucesso clínico, se não apresentar infecção persistente ou dor quando em função e/ou mobilidade, quando submetido às forças mastigatórias¹.

Nesse contexto, atualmente, as taxas de sucesso em reabilitações implanto-suportadas chegam acima de 95%, seguindo critérios mínimos de planejamento protético/cirúrgico do caso e dependendo de fatores como condições de saúde do paciente adequadas, técnica cirúrgica, material do implante e curva de aprendizado dos profissionais².

Implantes usinados ou apenas de titânio puros, sem um tratamento de superfície são materiais bionertes, o que pode resultar, quando em condições clínicas desfavoráveis, em osseointegração insatisfatória, tendo possibilidade de falha no implante. Sabe-se que essa superfície quando tratada poderá interagir com o meio após a inserção dos implantes, reduzindo os riscos de falhas na osseointegração. Entretanto, a ciência busca atualmente melhor entender essa interação, fato que ainda possui muitos pontos a serem elucidados; portanto, estudos sobre a modificação da superfície dos implantes continua sendo uma estratégia para reduzir essas falhas e potencializar a osseointegração^{3,4}.

Nas últimas décadas, pesquisadores da área da bioengenharia óssea têm aplicado conhecimentos científicos, interdisciplinares e multiprofissionais, para desenvolver novos materiais integrados às superfícies dos implantes metálicos com potencial de afetar positivamente a topografia, morfologia, características físico-química e favorecer a migração celular, a angiogênese, a deposição de matriz extracelular e a mineralização, visando acelerar a osseointegração e resultando em intervalos menores entre a instalação do implante e a reabilitação protética. De uma maneira abrangente, a osseointegração é definida como "uma conexão estrutural e funcional direta entre osso vivo ordenado e a superfície de um implante de suporte de carga". Contudo, os conhecimentos sobre como controlar e influenciar os processos biológicos que ocorrem na interface osso-implante, ainda não estão completamente esclarecidos⁵.

Para melhorar a osseointegração, muitas estratégias surgiram com foco nas modificações da superfície do implante⁶. A literatura mostra que as respostas

biológicas são alteradas de acordo com as modificações da rugosidade superficial, que pode ocorrer em três dimensões: nano-rugosidade (100 nm), micro-rugosidade (100µm) e sub-micro (1µm) rugosidade, que estão relacionadas com a geometria do implante^{107,109}. O tratamento de texturização/rugosidade busca alcançar um melhor contato osso-implante (BIC), havendo bastante divergência na literatura na escolha de parâmetros topográficos que promovam um aumento no BIC⁷.

Estudar e analisar a arquitetura das diferentes topografias de superfícies, nos permite compreender o funcionamento da osseointegração, podendo potencializá-la. A rugosidade da superfície do implante em escala micrométrica mostrou ter um grande impacto, e observou-se que uma superfície moderadamente rugosa demonstra resultados clínicos favoráveis⁸. Uma rugosidade micrométrica de superfície é relatada para aumentar a área de superfície do implante, o que pode aumentar o contato osso-implante⁹, e resultar em um melhor intertravamento biomecânico dos implantes no osso, sendo esta uma explicação para os melhores resultados clínicos observados¹⁰. Atualmente a indústria focaliza a fabricação de implantes com textura de superfície em escala nanométrica (quando analisada em magnitude de 100nm ou menos), uma vez que essas modificações podem alterar as interações da superfície com biomoléculas e células, influenciando a diferenciação, a adesão e a proliferação celular, aumentando ainda mais as chances de potencializar a osseointegração¹¹⁻¹⁴.

Os métodos atualmente empregados de tratamento de superfície são por adição ou subtração: a adição é adicionado ou integrado um revestimento ao titânio. Na subtração, a camada superficial do metal é removida, produzindo uma superfície final ou preparando a mesma para posterior adição de outro material, tendo como principal foco, em ambos os casos, induzir a molhabilidade e/ou energia de superfície¹⁵.

Dentre os materiais adicionados a superfícies para otimizá-la, o estrôncio vem ganhando destaque, por fazer parte da composição óssea e pela sua semelhança com o cálcio (Ca^{2+})^{16,17}.

Existem diversos estudos utilizando o estrôncio em tratamento de osteoporose, dores ósseas e tratamento de câncer no osso, podendo exercer efeitos duplos de estimulação da diferenciação dos osteoblastos e inibição da atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea^{18,19}.

Os mecanismos pelos quais o estrôncio afeta a remodelação óssea com duplo impacto sobre os osteoblastos e osteoclastos, permanece desconhecido. Resultados

in vitro demonstram que o ranelato de estrôncio age sobre a diferenciação osteogênica de células mesenquimais. Além disso, ele reduz a adesão dos osteoclastos ao osso, aumentando a atividade de fosfatase alcalina e a síntese de colágeno²⁰.

Marie¹⁰⁵, demonstrou a importância da dosagem correta de Sr^{2+} para produzir uma resposta efetiva no osso *in vivo*, altas doses de Sr^{2+} podem levar a um efeito negativo na mineralização óssea, pela menor absorção de Ca^{2+} que atua nas propriedades minerais do osso. Já as baixas doses, estimulam a formação do tecido ósseo.

Baseado no potencial do estrôncio, o nosso grupo tem estudado um novo tratamento de superfície, seguido de adição de estrôncio. Estudos *in vitro* foram realizados previamente sugerindo efeitos promissores e propondo a realização de estudos *in vivo*, apresentado no presente trabalho.

2 PROPOSIÇÃO

Em sequência aos estudos *in vitro* realizados anteriormente e considerando os resultados obtidos, o presente projeto tem por objetivo avaliar *in vivo*, em tíbias de ratos, os efeitos do tratamento de superfície, associado à adição de estrôncio (Sr^{2+}), na osseointegração de implantes de titânio comercialmente puros (Ticp).

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar o torque de remoção dos implantes com auxílio de torquímetro, após a eutanásia dos animais.

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a formação e qualidade óssea ao redor dos implantes, por meio da técnica de microtomografia digital computadorizada (micro-CT).

Avaliar a expressão gênica de moléculas relacionadas à osteogênese no tecido ósseo em contato com os implantes, por meio da técnica de RT-qPCR.

Avaliar histomorfometricamente o contato osso-implante (BIC) e a área de formação óssea ao redor da superfície das roscas (BA) em cortes não descalcificados produzidos por meio do sistema EXAKT.

Em estudo complementar *in vitro*, avaliar a expressão gênica e a produção de proteínas relacionadas à diferenciação e atividade osteoblástica em células pré-osteoblásticas de camundongos (MC3T3-E1), respectivamente, por meio das técnicas de RT-qPCR e ELISA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção foi subdividida em subtemas relacionados à temática da presente proposição, trazendo respaldo científico à pesquisa desenvolvida e apresentada neste trabalho acadêmico.

3.1 Tecido Ósseo e Osseointegração

O osso é um tecido formado por matéria orgânica e inorgânica, composto por fibras de colágeno enrijecidas com cristais de hidroxiapatita (HA) intercalados, sendo responsável pelo apoio, movimentação e proteção de órgãos internos. A matriz orgânica é composta basicamente por colágeno tipo I contendo proteoglicanas de baixa massa molecular, proteínas não colágenas e correspondem a 25% do seu peso; a parte mineral do osso corresponde a 65% de seu peso os 10% remanescentes são água²¹. Durante atividades como andar e mascar, são transferidas cargas pesadas de forma direta para sua estrutura, o que significa que os implantes artificiais precisam suportar essa carga. Estima-se que o ciclo de mascar, se dá na ordem 1×10^5 ciclos por ano e com uma força média de 700N, e suas propriedades são mantidas por meio de processos de remodelação contínua regulada pela “Lei de Wolff”^{21,22}.

O processo de osseointegração pode ser definida como uma cicatrização, cujo resultado é o estabelecimento e manutenção de uma fixação rígida clinicamente assintomática de um material aloplástico em osso sob carga funcional. De maneira sucinta, após instalação do implante, ele irá interagir por um recobrimento de proteínas presentes no sangue, seguido por um coágulo, sequestrando plaquetas e fatores de crescimento, sequenciado por uma diferenciação e mineralização celular. Posteriormente, ocorre um discreto crescimento ósseo e angiogênese com remodelação do osso do leito receptor²³.

3.2 Superfícies dos Implantes e Osseointegração

Descrito por Albrektsson²⁴ na década de 1980, a topografia da superfície foi identificada com um dos seis fatores relevantes para incorporação de implantes ao osso. Dependendo de sua configuração, poderá acelerar a formação óssea,

resultando em melhor estabilidade durante a fase de cicatrização e permitindo uma carga mastigatória mais precoce.

A instalação de implantes dentários no tecido ósseo fomenta uma sequência de eventos moleculares e celulares que levem à interação do osso do leito receptor e à superfície do implante. Neste contexto, as modificações topográficas das superfícies, com obtenção de texturas microtopográficas e nanotopográficas podem afetar essa interação. Além da modificação da textura, os tratamentos de superfície através da incorporação de substâncias aditivas criam uma topografia mais atrativa para diferenciação osteoblástica, adesão de proteínas e osteogênese. Em um estudo recente, comparando implantes com e sem nanotopografia, foi demonstrado que implantes com tratamento de superfície apresentaram maior prevalência de elementos como Ca e P no tecido mineralizado ao seu redor e foram mais resistentes ao processo de remoção por torque^{25,26}.

3.3 Tratamentos de Superfície dos Implantes

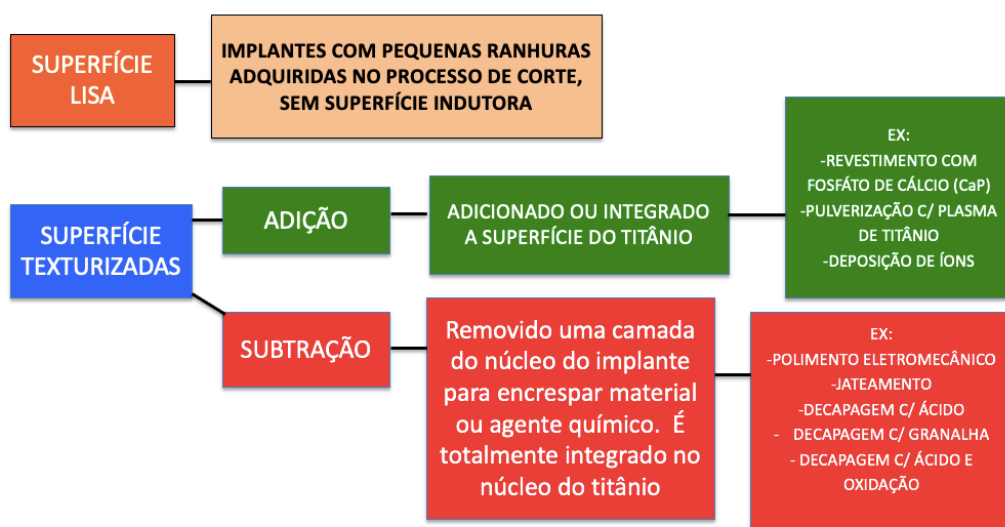
O Estudo da topografia de superfície de implantes foi um divisor de águas para área, sendo considerado de fundamental importância para compreensão da adesão e diferenciação dos osteoblastos e mineralização celular. Estudos mostram que a caracterização a nível micro e nano-escala pode influenciar o processo de cicatrização de forma positiva. Acredita-se que a nível nanométrico esses implantes com tratamento de superfície efetuem absorção de proteínas, assim beneficiando a adesão celular, além da precipitação de fosfato de cálcio, o que pode acelerar a estabilidade primária dos implantes²⁷.

As superfícies dos implantes podem ser tratadas por diversos métodos, classificado em métodos mecânicos, químicos e físicos. No implante dentário, o tratamento de superfície tem por objetivo modificar a topografia da superfície e a energia da superfície, resultando em uma melhor molhabilidade, aumento da proliferação e crescimento celular e processo de osseointegração acelerado²⁸⁻³².

As características macrométrica, micrométrica e nanométrica do implante determinarão o padrão de troca iônica com o osso peri-implantar. Em nível nano, suas características topográficas desempenham papel crucial na resposta celular. As superfícies com tratamento e/ou maior rugosidade e energia de superfície, tendem a aumentar o contato osso-implante acelerando assim a integração³³.

Os métodos de tratamentos de superfície podem ser realizados por meio da adição ou subtração de elementos: nos métodos de adição, um revestimento é adicionado ou integrado ao titânio, destacando-se a pulverização de plasma de titânio (TPS), plasma de hidroxiapatita (HA), alumina, fosfato de cálcio (CaP) dentre outros. Nos métodos de subtração, uma camada da superfície do metal é removida por meio de jateamentos, ataque ácido e anodização, entre outras, tendo como principal foco induzir a molhabilidade e/ou energia de superfície (Figura 1)³⁴. A bioatividade do implante é afetada por modificações químicas da sua superfície, como tratamentos térmicos alcalinos, condicionamento ácido, oxidação eletroquímica, tratamentos pelo método sol-gel, pulverização por plasma, e implantação de íons. A camada superficial modificada induz uma troca contínua de fluidos e íons, que pode estimular a ligação de proteínas à superfície e as reações celulares subsequentes relacionadas à sua ligação bioquímica³⁵⁻³⁹.

Figura 01 – Organograma dos diferentes métodos de tratamento das superfícies de implantes



Fonte: Adaptado de Alves¹⁵.

Segundo Wennerberg e Albrektsson²⁴, as superfícies dos implantes podem ser divididas categoricamente como: rugosa ($S_a > 2,0 \mu\text{m}$), (S_a = média aritmética da rugosidade da superfície medida em três dimensões sobre um plano); minimamente rugosa ($S_a = 0,5$ a $1,0 \mu\text{m}$); moderadamente rugosa ($S_a = 1,0$ a $2,0 \mu\text{m}$); lisa ($S_a < 0,5 \mu\text{m}$). Os melhores resultados biológicos são obtidos por superfícies mais rugosas.

Porém, em uma revisão sistemática os autores concluem que a rugosidade moderada é a ideal, visto que as superfícies muito ásperas podem apresentar distâncias mínimas entre os picos da superfície do metal fazendo as células entende-las como superfícies lisas; entretanto, a literatura apresenta bastante divergência com relação à caracterização “superfícies lisas” ou ásperas¹⁹. Esse resultado foi também suportado por outro estudo, comparando superfícies com micro- rugosidades, no qual foram confirmados os efeitos benéficos das superfícies moderadamente rugosas na diferenciação de osteoblastos e de migração celular⁴⁰.

3.3.1 Tratamento de superfície por métodos ácidos

O tratamento superficial de Ti e suas ligas pode ser realizado por meio do condicionamento com ácidos, como o ácido fluorídrico (HF), ácido nítrico, sulfúrico ou duplo ataque ácido (DAE), a fim de se obter uma camada estável de óxido. A concentração de ácido, o tempo e a temperatura são fatores determinantes da microestrutura da superfície. Este tipo de superfície pode combinar uma macrotexturização feita com o jateamento de partículas com a microtexturização causada pelo ataque ácido⁴¹⁻⁴⁸.

Vários estudos demonstram que o tratamento com ácido causa mudanças na camada de óxido (TiO₂) e na estrutura da superfície de titânio e de zircônia. Em alguns estudos com superfície ácida foi demonstrado um melhor desempenho biomecânico, à medida que o período experimental avança o contato osso/implante melhora, demonstrando maior grau de mineralização óssea⁴¹⁻⁴⁸.

3.3.2 Tratamento de superfície por métodos alcalinos

Nos últimos 10 anos o tratamento alcalino do titânio e suas ligas demonstraram poder produzir estruturas complexas em superfície de nanoescala, o que atraiu consideravelmente a atenção de diversos pesquisadores. Kim et al.⁴⁹ foram os primeiros a demonstrar tratamento alcalino em superfície de titânio, indicando sua bioatividade favorável e observando a formação de apatita na superfície. Xing et al.⁵¹ determinaram as concentrações adequadas de NaOH para produção de estrutura de nano redes homogêneas, e sugeriram suas vantagens em relação à atividade osteogênica. Portanto, o tratamento alcalino é considerado uma técnica adequada

para a melhora da superfície do titânio de maneira considerável, aumentando o seu desempenho na osseointegração⁴⁹⁻⁵¹.

3.3.3 Tratamento de superfície com metais

Entre as matérias-primas para obtenção ou associação com implantes, como zircônia e metais (alumínio, vanádio, titânio puro e dos diferentes graus), os metais possuem destaque pelos mais de 50 anos de estudos e casuística com implantes usinados, e também devido a alta resistência à fadiga e o grande desempenho mecânico. As aplicações mais comuns são em: parafusos ortopédicos, placas de fraturas, fios, implantes dentários, prótese de articulações, assim como também os substitutos ósseos⁵².

A grande versatilidade dos metais para ser usado com matérias biológicas, deve-se também, à não abrasividade, polimento e facilidade em esterilização sem mudar sua conformidade estrutural. Para serem utilizados com segurança no corpo humano, esses metais devem apresentar alguns requisitos mínimos como: ser biocompatível, não produzir reações inflamatórias, alérgicas ou tóxicas, e ser quimicamente estável⁵³.

Muitos trabalhos concluíram que a combinação de materiais orgânicos e inorgânicos para revestimentos poderia fornecer uma camada excelente e com maior resistência à corrosão para substratos metálicos^{53,54}.

Sul et al.^{55,56}, sugeriram que ligações bioquímicas baseadas na química bioativa da superfície representada por ATiOxB (A: cátions metálicos; óxidos / hidróxidos de titânio; e B: ânions metálicos) podem melhorar as respostas ósseas. Vários estudos também demonstraram que tratamentos baseados na química ATiOxB, incluindo incorporação de ânion e incorporação de cátion (ex: cálcio [Ca], magnésio [Mg], estrôncio [Sr]), influenciam mais positivamente a resposta óssea devido às propriedades topográficas da superfície.

3.3.4 Tratamento de superfície com adição de estrôncio

Entre os elementos bioativos encontrados no osso, o Sr^{2+} é o mais amplamente estudado devido ao seu duplo efeito no metabolismo esquelético, promovendo a osteogênese e suprimindo a reabsorção osteoclástica⁵⁷⁻⁶⁰.

Os mecanismos pelos quais o estrôncio afeta a remodelação óssea com duplo impacto sobre os osteoblastos e osteoclastos, permanece desconhecido. Resultados *in vitro* demonstram que o ranelato de estrôncio age sobre a diferenciação osteogênica de células mesenquimais. Além disso, ele reduz a adesão dos osteoclastos ao osso, aumentando a atividade de fosfatase alcalina e a síntese de colágeno^{58,61}. O ranelato de estrôncio é um medicamento anti-osteoporose que demonstrou uma alta eficiência em pacientes com distúrbios metabólicos ósseos, apresentando um papel crucial na formação óssea através dos seus íons atuantes na estimulação e proliferação osteogênica, além de efeito inibidor da reabsorção óssea, diminuindo a produção de metaloproteinase da matriz óssea⁶²⁻⁶⁸.

A literatura demonstra diversos métodos de incorporação de estrôncio, como: hidrotérmicos, anodização e magnéton co-sputtering^{69,70}. O método hidrotérmico é uma alternativa simples e de baixo custo, demonstrando viabilidade na incorporação na superfície do titânio⁷¹⁻⁷³. Estudos *in vitro* em animais saudáveis^{74,75}, nos quais o estrôncio foi adicionado à superfície de implantes através de método hidrotérmico, demonstraram melhor integração óssea. Também foram encontrados resultados positivos em outro estudo na osseointegração precoce em coelhos osteoporóticos⁷⁶.

Em uma revisão sistemática⁴⁹ que seguiu a metodologia PRISMA sobre tratamento de superfície com estrôncio, foi demonstrado que em um total de 11 (onze) estudos, 9 (nove) relataram que os implantes de titânio adicionado com estrôncio mostraram significativamente maior BIC, concluindo também que esta adição melhora as propriedades biomecânicas dos implantes. Perante as pesquisas que fizeram análise por torque de remoção, houve um aumento significativo com a adição de estrôncio, melhorando a osseointegração e microarquitetura do tecido ósseo⁴⁰.

Em um estudo recente⁷⁷, no qual se analisou por meio de torque de remoção e análise histológica a superfície de implantes SLA com adição de estrôncio pelo método hidrotermal, observou-se melhoras significativas nas trabéculas ósseas e matriz óssea no grupo SLA-Sr, possuindo uma camada mais densa e contínua de osso lamelar quando comparada ao grupo SLA, consequentemente maior BIC e BA e um aumento considerável no toque de remoção. Em outro artigo⁷⁸ com metodologia semelhante à do estudo anterior (SLA- Sr e SLA), porém em ratos com osteoporose induzida, também foram observados resultados positivos ao incremento do Sr²⁺.

Em outro estudo⁷⁹ sobre estrôncio adicionado pelo método hidrotermal, que utilizou o modelo animal de diabetes induzida, e avaliou contato osso-implante (BIC%)

e a área óssea (BA%), foi demonstrado que o grupo do estrôncio (SLA-Sr) apresentou maior BIC%, além de uma menor inflamação.

Um estudo recente *in vitro*⁸⁰ mostrou ação positiva do estrôncio no potencial osteogênico e efeito anti-inflamatório em pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e macrófagos (RAW264.7) de camundongos. Em análise proteômica foram identificadas 46 proteínas aderentes aos revestimentos, com diferença significativa na afinidade às superfícies, sendo que nas superfícies com estrôncio, 6 proteínas tiveram afinidade reduzida de adesão e 40 apresentaram afinidade aumentada em relação à superfície sem estrôncio.

Em uma revisão sistemática publicada em 2022⁸¹, onde se avaliou a eficácia de suplementação de estrôncio (por via oral) e sua incorporação na superfície dos implantes (liberação local) na osseointegração de implantes em condições osteoporóticas, foram incluídos quatorze ensaios pré-clínicos com diversos modelos animais, em um total de 404 animais ovariectomizados, sendo elegíveis 789 implantes perante o estudo. Os resultados revelaram que a suplementação com estrôncio (sistêmica ou local) promoveu um aumento significativo, em média, de 17,1% no contato osso implante (BIC%) e 13,5 na área óssea (BA%). Análise por uCT demonstrou que o implante enriquecido com estrôncio tende a otimizar a resistência mecânica do osso recém-formado.

O efeito do íon Sr^{2+} na proliferação celular está diretamente relacionado com a sua concentração, uma alta dosagem terá efeitos adversos na mineralização óssea, enquanto uma baixa dosagem não irá contribuir para formação óssea^{54,55}. Sobre a concentração, Silas et al.⁵⁶ em um estudo *in vitro*, apontam que a concentração entre 0,21 e 21,07 ppm no meio de cultura de células levaria a uma maior atividade da fosfatase alcalina. O estudo de Li et al.⁵³ (2019), *in vivo*, reforça as concentrações do artigo anterior ($\leq 0,49 \mu\text{g} / \text{ml}$ por dia, 1 ppb = $1.000 \mu\text{g} / \text{ml}$). Esse percentual de concentração entre 0,21 e 21,07ppm nos estudos supracitados, é reforçado por diversos artigos^{79,82,84-89}.

3.3.5 Combinação de tratamento químico e adição de estrôncio na superfície de implantes

Baseado no exposto e considerando os benefícios individuais de cada tratamento de superfície, nosso grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Joni Cirelli e em colaboração com a empresa Extremus - Smart Surface (São Carlos/SP), tem

trabalhado na avaliação e associação de novas substâncias às superfícies desenvolvidas pela empresa Extremus. Em estudos prévios pela avaliações *in vitro* de propriedades físico-químicas e biológicas, foi demonstrado, que o tratamento de superfície, proporcionam uma superfície com alterações em escala micro e nanotexturas⁹⁰. Sua associação com a adição de estrôncio por método hidrotermal também foi testada demonstrando-se promissor para melhorar as propriedades dos implantes, visando a aplicação em áreas com osso de baixa qualidade ou em pacientes com alterações sistêmicas que comprometam a osseointegração⁹¹.

Em outro estudo do grupo, os resultados da caracterização física demonstram, por meio da análise da rugosidade superficial das amostras, bem como, da área efetiva superficial, que os tratamentos físicos e químicos utilizados, foram eficazes em alterar o padrão topográfico das amostras de Ticp⁹². A caracterização biológica das amostras, apontam resultados favoráveis para o desenvolvimento das células precursoras ósseas, visto que, pela análise da viabilidade celular, utilizando-se o reagente Alamar Blue[®], associada aos testes de MEV (adesão celular) e Fluorescência Direta (morfologia celular), as células demonstram-se viáveis, aderidas e com padrão de diferenciação celular avançado, confirmado pela análise da expressão gênica de proteínas presentes na via osteogênica (*Bmp-2*, *Spp1*, *Cd36*). Sendo assim, concluímos que o desenvolvimento destas superfícies, com o padrão topográfico apresentado, é favorável à diferenciação das células precursoras ósseas, agindo diretamente na melhoria das reações/interações do metal com as células presentes nos sítios que recebem os implantes dentários. Estes processos celulares podem ser acelerados, favorecendo a osseointegração, em regiões com qualidades ósseas deficientes, provenientes de alterações sistêmicas metabólicas (Diabetes Mellitus e Osteoporose) que dificultam a osseointegração dos implantes dentários.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, ambas disponíveis em www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea, sendo que o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (FOAr-UNESP), com número de registro 14/2020 (ANEXO 1). A Metodologia segue parâmetros ARRIVE 2.0.

4.1 Confeção dos Implantes

Foram utilizados implantes especialmente desenvolvidos para o projeto. Os implantes utilizados nesse trabalho foram confeccionados a partir de barras de titânio comercialmente puro, pela empresa colaboradora Implalife Biotecnologia, Araçatuba-SP sob a supervisão do pesquisador Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, com 2.2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento. Após usinados, os implantes receberam os tratamentos de superfície da empresa Extremus Smart Surface (São Carlos, SP), e esterilizados através de irradiador multipropósito do IPEN/USP em dose de 25kGy, onde posteriormente foram feitos Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar e confirmar a presença das superfícies após a esterilização, como mostra a figura 2.

4.2 Grupos Experimentais

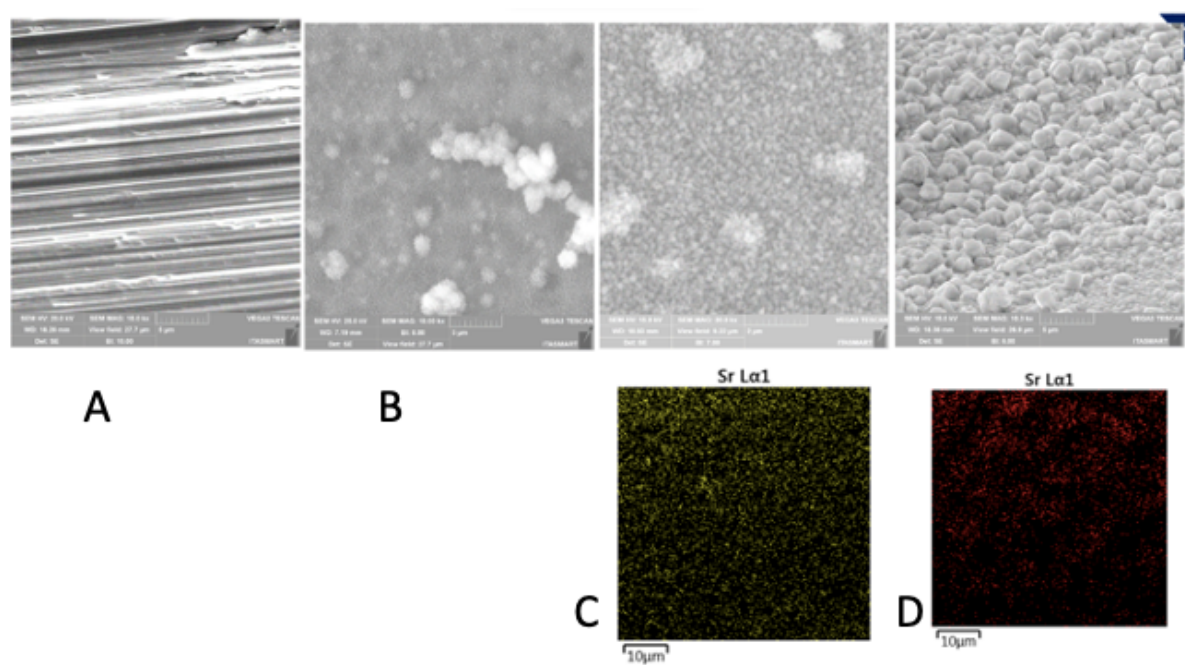
Grupo 1: Superfície usinada - acabamento superficial ocasionado pelo processo de usinagem (**U**);

Grupo 2: superfície tratada micro e nano topográficas (**MN**);

Grupo 3: superfície MN, seguido à adição de estrôncio (**MNSr**);

Grupo 4: superfície MN, seguido da adição de maior quantidade de estrôncio (**MNSr+**).

Figura 02 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies*



A) topografia usinada

B) micro e nano topográfica

C) micro e nanotopográfica com Sr^{+2} (em amarelo o mapeamento do Sr^{2+})

D) Micro e nanotopográfica com mais Sr^{+2} (em vermelho o mapeamento do Sr^{2+})

* As superfícies foram desenvolvidas e produzidas no laboratório de desenvolvimento de tecnologia da Extremus Smart Surface.

Fonte: Acervo da própria pesquisa.

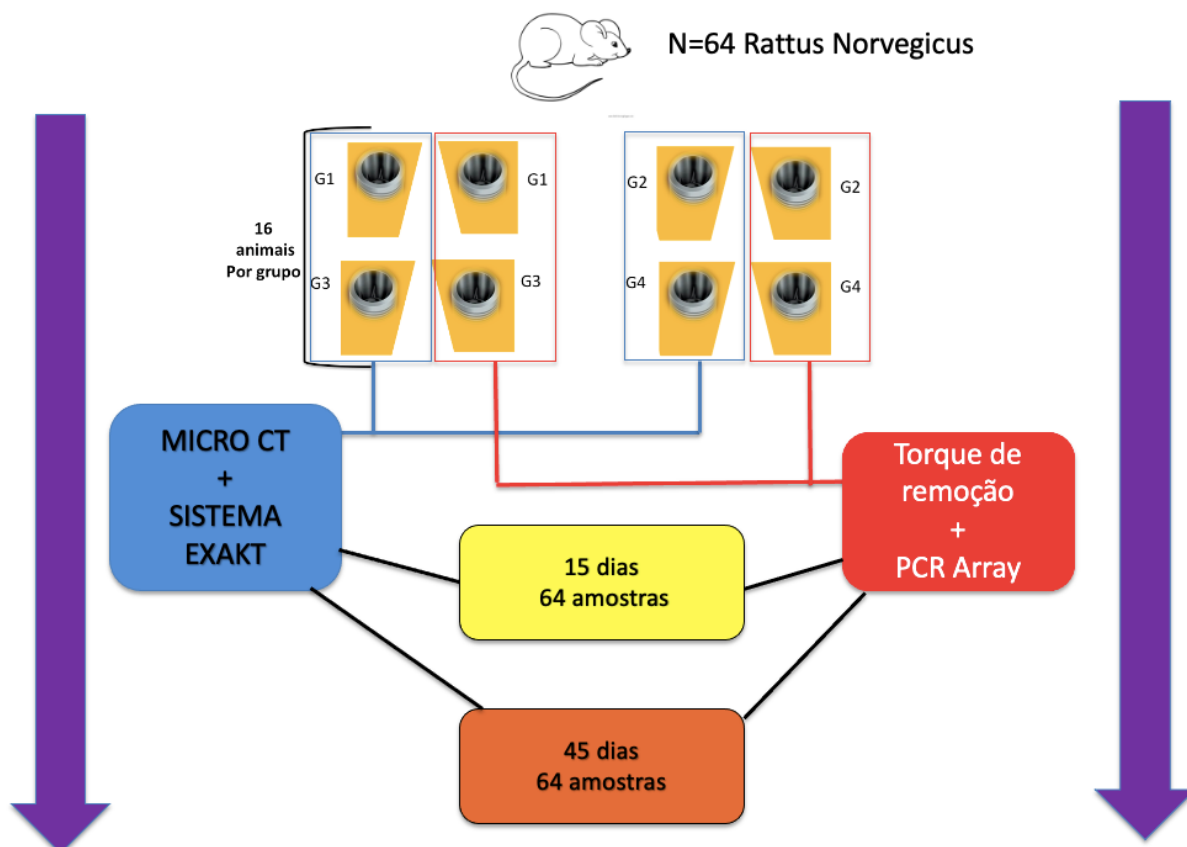
4.3 Desenho Experimental

No presente estudo foram utilizados 64 ratos da linhagem Rattus Norvegicus, variação albinus, Holtzman, machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal entre 300 e 350 gramas, originários do Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP).

O sítio de implantação foi a tíbia, bilateralmente, de cada animal. No processo experimental os animais foram randomicamente distribuídos igualmente em quatro

grupos de acordo com os tratamentos de superfícies, descritos acima, totalizando 16 animais por grupo, e um total de 128 implantes instalados (Figura 03).

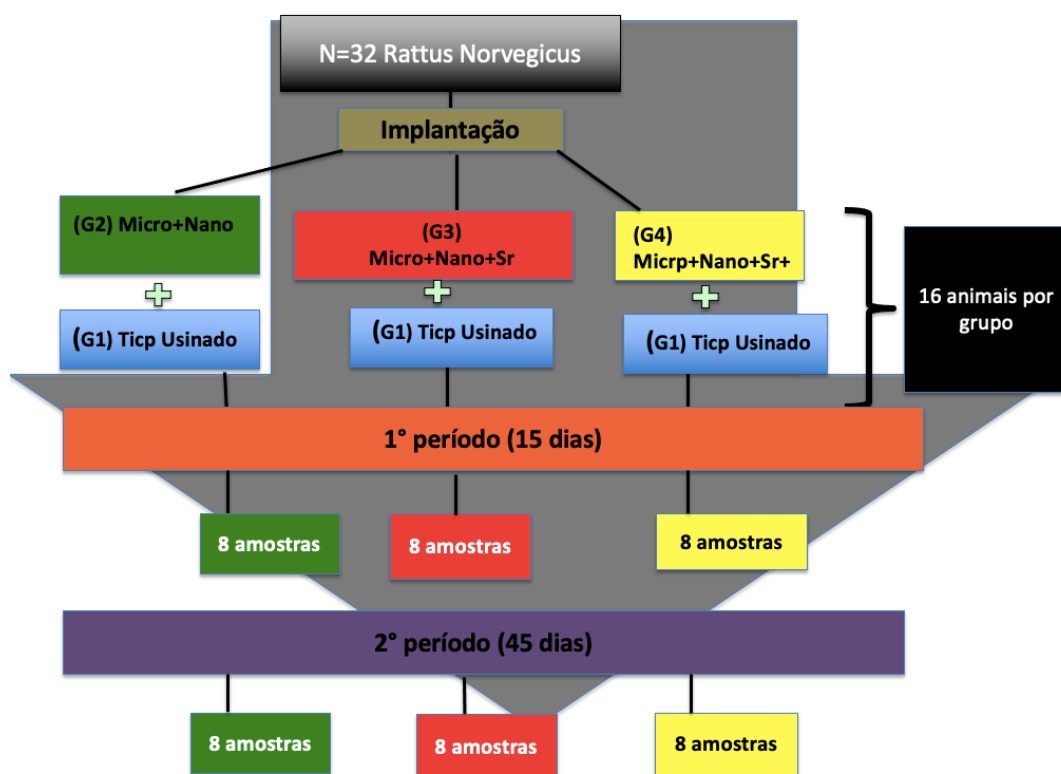
Figura 03 – Desenho experimental do estudo



Fonte: Elaboração própria.

Ao final da realização dos tratamentos, os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura controlada. O ambiente de alocação possui exaustor de ar, onde a ventilação sempre está sendo renovada. A dieta desenvolvida para o experimento foi composta por ração comercial sólida, com acesso a água *ad libitum* filtrada durante todo o período experimental. Ademais, neste estudo, no décimo quinto (15) e no quadragésimo quinto (45) dia, os animais foram eutanasiados para remoção e avaliação do tecido ósseo contendo o implante e tecido ósseo adjacente (Figura 04). A distribuição dos animais entre os grupos foi feita aleatoriamente, por randomização, e ambos os sítios de cada animal receberam o mesmo tratamento.

Figura 04 – Organograma com a distribuição dos animais nos grupos e períodos experimentais



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Procedimento de Cirurgia e Eutanásia

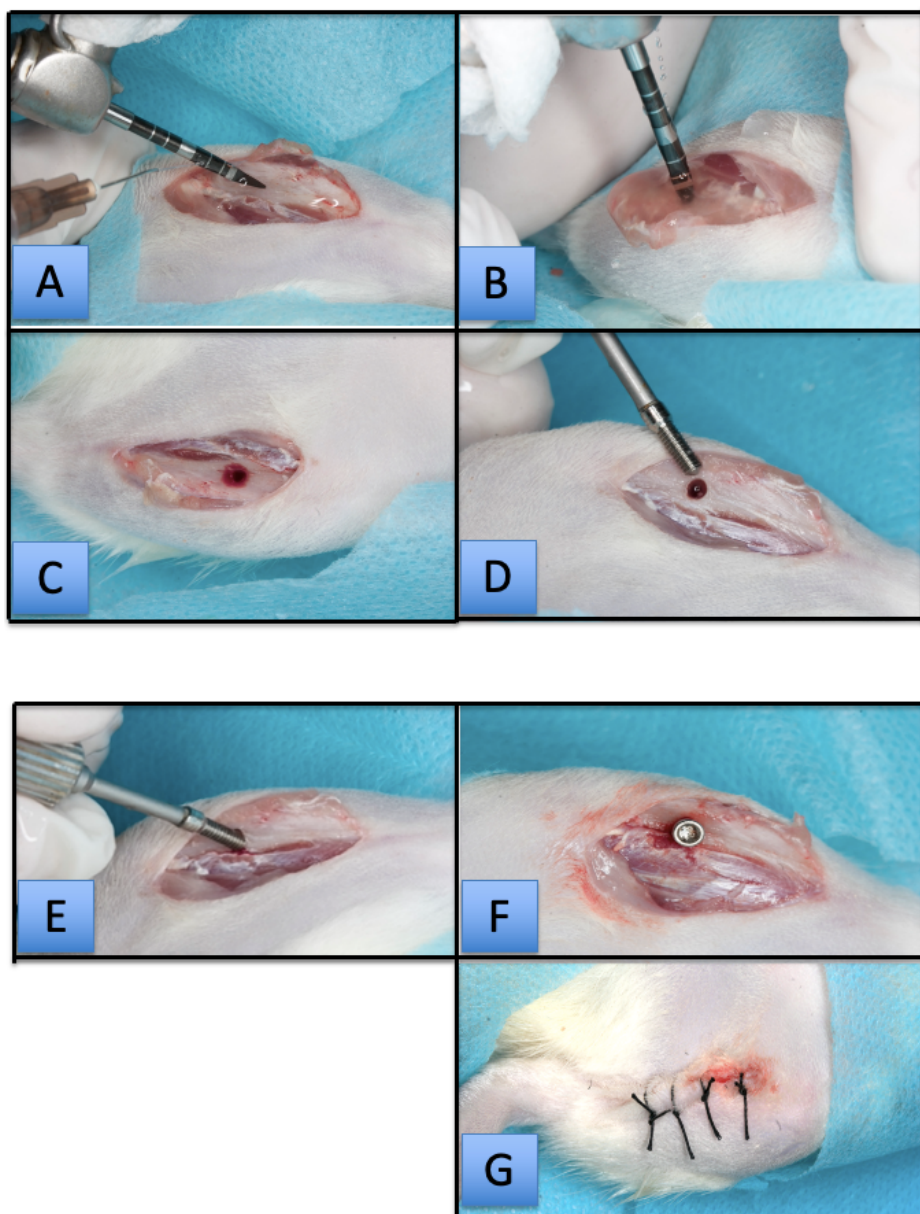
Sequência do procedimento de instalação dos implantes e eutanásia executados de modo padronizado nos animais, e com cirurgião único e treinado através de cirurgia piloto.

4.4.1 Instalação dos implantes

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina 10% – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. e com. Ltda.), respectivamente. Após imobilização em decúbito ventral os animais foram submetidos à tricotomia da região interna das patas direita e esquerda e realizada a

antisepsia com gaze estéril embebida em solução de povidine a 10%. Foi feita uma incisão de aproximadamente 10 mm em planos sobre a metáfise tibial, e posteriormente feita a dissecação dos tecidos, realizando-se a osteotomia por meio de uma fresa lança, sob irrigação de solução fisiológica em abundância, e posteriormente a instalação do implante (Figura 05).

Figura 05 - Sequência (A a G) Cirurgia para instalação dos implantes



Perfuração com broca lança e irrigação abundante e preparo do leito para receber o implante e posteriormente sutura do leito cirúrgico.

Fonte: Acervo da própria pesquisa.

4.4.2 Eutanásia e obtenção das amostras

Após os períodos experimentais propostos (15 e 45 dias) os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (3x vezes a dose anestésica) e as tíbias removidas. As tíbias esquerdas (64 implantes) foram utilizadas para a avaliação biomecânica (torque de remoção) e de expressão gênica no tecido ósseo alveolar

(RT-qPCR) e as tíbias direitas (64 implantes) foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Estas amostras foram avaliadas por meio de análise radiográfica tridimensional (Microtomografia computadorizada, Micro-CT) e análise histomorfométrica após processamento por meio do sistema EXAKT.

4.5 Análises *In Vivo*: Processamento das Amostras e Análises

As amostras foram divididas didaticamente em análises *in vivo* e *in vitro* utilizando o osso da tíbia remanescente dos ratos.

4.5.1 Avaliação do torque de remoção dos implantes

Após a eutanásia dos animais, as tíbias foram removidas e estabilizadas em uma pequena morsa. Uma chave compatível foi conectada nos implantes e no torquímetro (Tohnichi ATG24CN-S, Japan), e foram realizados movimentos no sentido anti-horário, de desrosqueamento dos implantes, para aferir a força do torque de remoção dos mesmos.

4.5.2 Avaliação da expressão gênica no osso alveolar (RT-qPCR)

Após a realização do teste de torque de remoção, o osso remanescente do sítio ao redor dos implantes de cada grupo foi removido, dando uma margem de 2mm do sítio do implante e armazenado em nitrogênio líquido e transferido para o freezer - 80°C para posterior extração de RNA. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido, e em seguida a extração do RNA total foi realizada com TRIzol™ Reagent (catálogo no 15596018, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e PureLink™ RNA Mini Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Além disso, foi realizado tratamento com DNase (RNase-FreeDNase Set – catálogo no 79254, Qiagen, Hilden, Alemanha) de modo a eliminar contaminação com DNA genômico. A quantidade e pureza do RNA foram medidos em espectrofotômetro de luz NanoVue UV/Visible Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ) por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente. Em seguida, a reação de transcriptase reversa para

síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando 1000 ng do total de RNA de cada amostra foi realizada utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (catálogo no 4368814, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). 1 uL do produto da reação de RT foi utilizado em um volume total de reação de PCR de 10 uL. Este volume inclui, além do produto da reação de RT, água livre de nucleases, TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) para os genes alvo de rato: fosfatase alcalina (ALPL1, catálogo no Rn01516028_m1), osteocalcina (BGLAP, catálogo no. Rn00566386_g1), e fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX2, catálogo no. Rn01512298_m1). O gene para controle endógeno da reação foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, catálogo no. Rn01775763_g1), cujo nível de expressão foi utilizado para normalizar a expressão dos genes de interesse. As condições pré-otimizadas de ciclagem recomendadas pelo fabricante foram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão à 60°C por 1 minuto. Após normalização pela expressão do gene controle endógeno (GAPDH), foram obtidos os valores de expressão para cada gene alvo (ΔCt). A média dos valores de ΔCt de cada gene alvo referente foram comparados entre os grupos e transformados em fold-change em relação ao grupo controle para representação gráfica.

4.5.3 Análise por Micro-CT

As tíbias direitas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas e posteriormente armazenado em etanol 70°. Essas amostras foram escaneadas por um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1176, Aatselaar, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12,45; Potência (tensão) do tubo de raios X: 65 kVP, corrente de raios X: 385 μA , tempo de integração: 300 ms, filtro de cobre e alumínio de 1 mm, e tamanho do voxel: 18 μm^3 .

As imagens foram reconstruídas, reposicionadas espacialmente e analisados por software específico (NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Bélgica). Os parâmetros definidos para reconstrução foram: correção de artefato (2), beam-

hardening correction 30% e smoothing 2%. A região de interesse (ROI) foi definida como uma região circular de 0,5 mm ao redor de todo o diâmetro do implante, delineada a cada 10 planos. Este ROI foi definido como o volume total (margem de 0,5 mm em torno implantes—4,5 mm × 3,2 mm). O limite utilizado na análise foi 25–90 em escala de cinza e os valores de volume do tecido mineralizado ao redor dos implantes foram obtidos em porcentagem. Os parâmetros arquiteturais ósseos avaliados foram volume ósseo (BV), volume tecidual (TV), fração de volume ósseo (BV/TV), espessura de trabéculas (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N). Foi escalado um examinador treinado e cego para os grupos experimentais para realizar esta análise.

4.5.4 Avaliação histomorfométrica através do sistema EXAKT

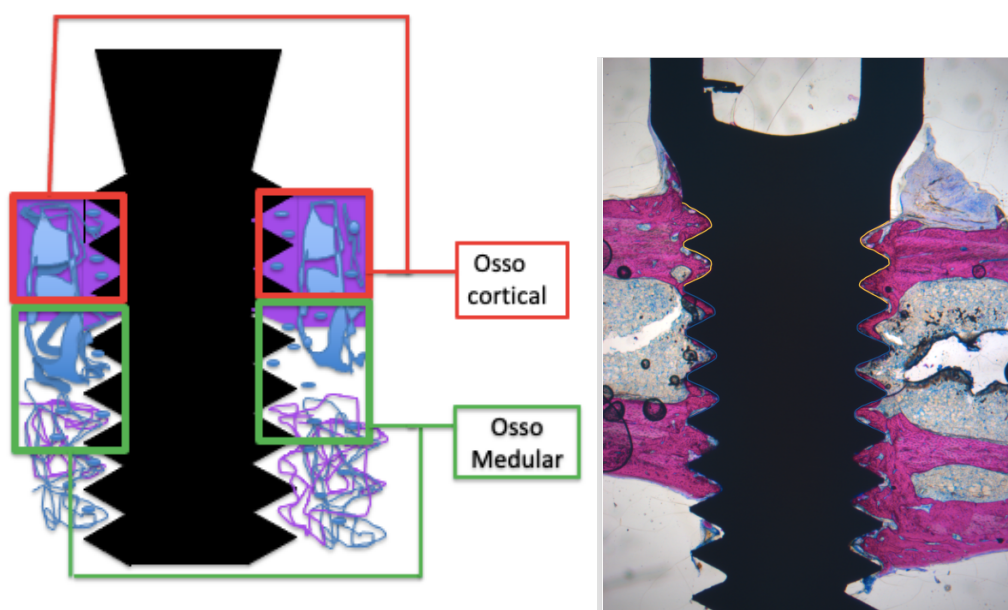
Cada amostra obtida foi cuidadosamente analisada macro e microscopicamente para registrar a extensão da reação tecidual observada. A resposta tecidual foi avaliada na área compreendida nas regiões circunjacentes ao implante e a interface óssea.

Após o processo de fixação, posterior lavagem com água, armazenamento em álcool 70% e escaneamento, as amostras foram desidratadas progressivamente em soluções de álcool etílico (80%, 90% e absoluto). A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, finalizando-se com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Os cassetes foram mergulhados em recipientes contendo a resina 7200, de forma gradativa – Álcool/Resina 70/30, 50/50, 30/70, 100, 100. Tempo: 3 a 7 dias em cada solução; exceto em resina absoluta (10 dias em cada).

Após a infiltração plástica, as lâminas foram incluídas em resina e polimerizadas. Os blocos foram montados em lâmina acrílica com o auxílio da resina Tecnovit 4000 (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). As lâminas passaram pelos cortes de 180µm, 120µm, 80µm até chegar em 50µm. A coloração das lâminas foi feita com o corante Stevenel's Blue, para a avaliação do percentual do osso neoformado, por meio da medida BIC (*Bone Implant Contact* - contato osso/implante); e da área de formação óssea próximo à superfície do implante - BA (*Bone Area* - área óssea no interior das roscas). Para padronização de análise, foram criados dois sub-grupos: contabilizando cinco vales de cada lado de implante. O primeiro grupo: 1) Espaço cortical (porção

mais coronal), onde foram contabilizando as duas primeiras roscas para este grupo; e o segundo, 2) Espaço medular, correspondendo á área mais central, onde foram excluídos os dois primeiros vales e incluídos os três subsequentes de cada lado (Conforme Figura 6), utilizando-se um microscópio de luz convencional DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), em aumentos de 40/10 vezes.

Figura 06 – Análise histométrica para as medidas de BIC e BA



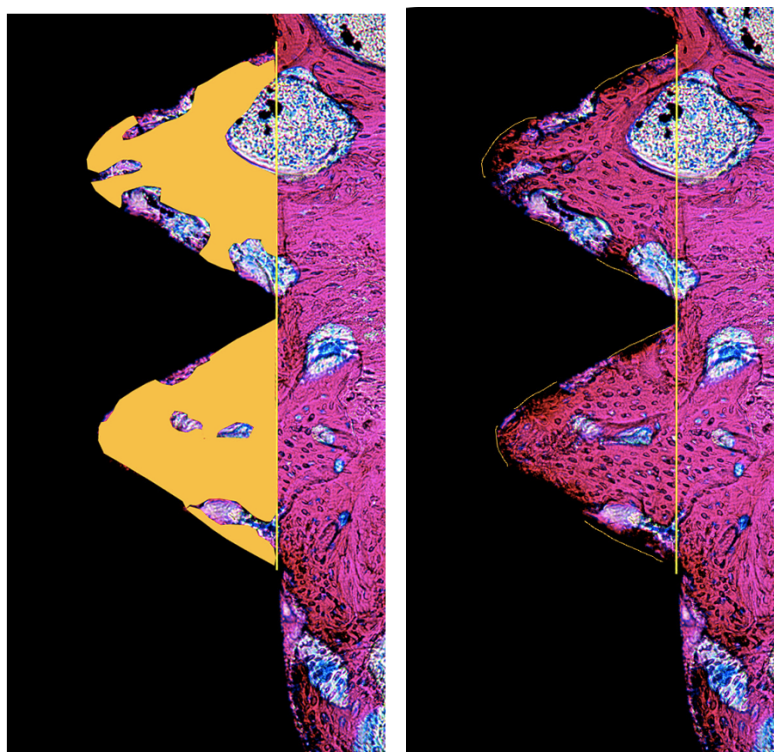
A)

B)

A) Desenho esquemático do implante com áreas destacadas em vermelho, correspondendo ao osso cortical, sendo considerado dois vales, e área destacada em verde, correspondendo ao espaço medular, sendo considerado três vales. B) Corte histológico (2,5x) representativo das áreas mensuradas, delineadas em amarelo (roscas do osso cortical) e em azul (roscas da área medular).

Fonte: Elaboração e acervo da própria da pesquisa.

Figura 07 – Cortes histológicos (10x)



A)

B)

Demonstrando em:

A) a mensuração do BA cortical e em

B) linha amarela em contato com a superfície do implante, correspondendo ao BIC cortical.

Fonte: Elaboração e acervo da própria pesquisa.

As imagens capturadas foram enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 13 megapíxels, e salvas sob a extensão TIFF. A determinação dos valores foi feita utilizando-se um software analisador de imagens (ImageJ 1.45s, NIH, EUA). Os valores para a extensão linear de contato osso/implante e para a área óssea foram obtidos em μm e μm^2 , respectivamente. As avaliações foram realizadas por um examinador treinado previamente através de algumas análises prévias de modo aleatório, sendo cegado para os grupos experimentais.

4.5.5 Análise estatística

Os resultados das avaliações biomecânicas, microtomográfica, histomorfométrica e o RT-qPCR foram digitados e tabulados no Excel e importados para o software GraphPad Prism versão 60 para tratamento e geração dos resultados. Primeiramente, realizamos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para confirmação do comportamento da normalidade dos dados. Em seguida, testes paramétricos de comparação média entre os grupos para modelos de medidas repetidas foram realizados pelo método de Análise de Variância a dois critérios (2 way-ANOVA), e teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.6 Análise *In Vitro* Complementar

Análises complementares foram realizadas *in vitro* durante o estágio de doutorado sanduíche do candidato, na Johannes Gutenberg-Universität Mainz, na Alemanha, conforme descrito abaixo. Para estas análises, discos de Ticp de 13 x 2 mm de diâmetro/espessura, receberam os tratamentos de superfície, similares aos implantes estudados no experimento *in vivo*.

4.6.1 Cultura de células

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular murina pré-osteoblástica MC3T3-E1 (ATCC, EUA). As células foram cultivadas em meio essencial alfa-mínimo (α -MEM, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 100 U de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen). As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ e o meio de cultura celular foi trocado a cada dois dias. As células MC3T3 foram semeadas (2x10⁴ células/disco) nos discos experimentais em uma gota de 50 μ l em uma placa de cultura de células de 24 poços. Após 4 h, o volume final do poço foi completado para 1 mL. Para os experimentos, 10 mM de β -glicerofosfato (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha) e 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Carl Roth) foram adicionados ao meio. Discos não tratados serviram como controle

4.6.2 Expressão gênica de marcadores ósseos por RT-qPCR

A extração de RNA foi realizada usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a concentração de RNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Quinhentos ng de RNA total foram transcritos reversamente usando o Kit iScrip Select cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Munique, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Expressão gênica de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), proteína morfogenética óssea 2 (Bmp2), osteopontina (Spp1), sialoproteína óssea (Ibsp), osteocalcina (Bglap), fator de transcrição runt-related 2 (RUNX2), colágeno tipo I cadeia alfa 1 (Col1a1) e fosfatase alcalina (Alpl1) foi analisada por PCR em tempo real usando o termociclador de PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories), SYBR green PCR master mix (Qiagen QuantiFast SYBR Green PCR Kit, Qiagen) e primers de camundongo (QuantiTect Primer Assay, Qiagen). Um µl de cDNA foi misturado com 12,5 µl de master mix, 2,5 µl de primer e 9 µl de água livre de nuclease. A mistura foi aquecida a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e uma etapa combinada de anelamento/extensão a 60 °C por 30 segundos. Os dados foram analisados pelo método comparativo dos ciclos limiares (delta/delta-CT).

4.6.3 Produção proteica de marcadores ósseos por ELISA

Kits ELISA comercialmente disponíveis foram usados para medir os níveis de proteína de BMP-2 (Human/Murine/Rat BMP2 ELISA Development Kit, 900-K255, PeproTech, Cranbury, NJ, EUA) e Opn (RayBio Mouse OPN ELISA Kit, ELM-OPN, RayBiotech, Peachtree Corners, GA, EUA) em sobrenadantes celulares de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica foi determinada usando um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) ajustado para 450 nm para Spp1 e a 405 nm com correção de comprimento de onda ajustado para 650 nm para BMP-2.

Os resultados da densidade óptica foram normalizados pelo número de células sobre cada disco. Para isto, após 7 dias do plaqueamento, as células aderidas sobre os discos foram lavadas duas vezes com 500 µl de solução salina tamponada com

fosfato (PBS, Invitrogen) e, posteriormente, incubadas com 100 µl de 0,25% tripsina/EDTA (Invitrogen), por 5 min. A solução de tripsina/EDTA foi neutralizada pela adição de 1 ml de α -MEM suplementado com 10% de FBS. A suspensão celular foi coletada e centrifugada a 1.300 g em temperatura ambiente por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de α -MEM. Finalmente, as células foram contadas com um hemocítômetro (Blaubrand Neubauer, Brand, Wertheim, Alemanha).

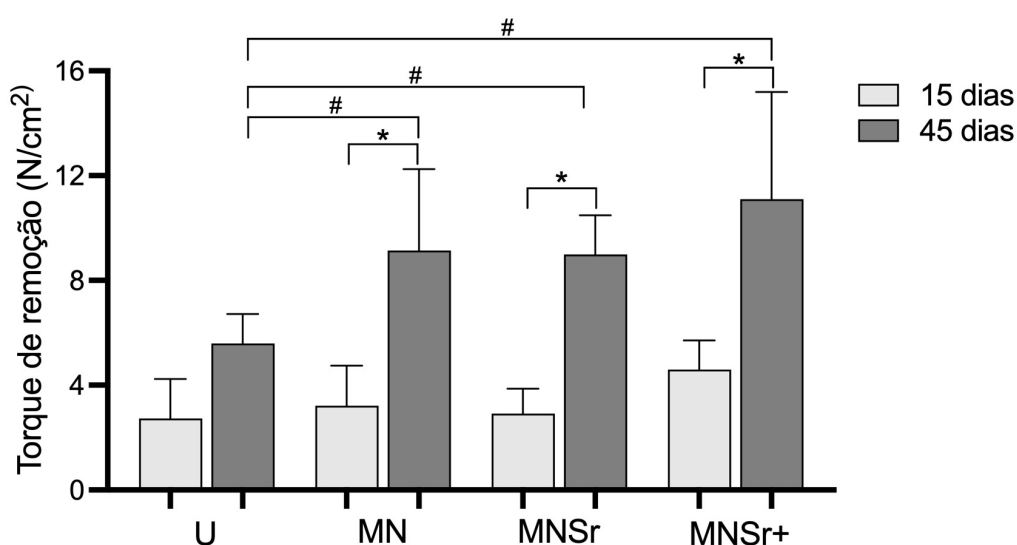
5 RESULTADOS

A seguir os resultados *in vivo* e *in vitro*

5.1 Torque de Remoção

Na análise do torque de remoção (Fig. 08 e Tabela 01), observou-se diferenças intragrupos significantes, entre os períodos de 15 e 45 dias, para os três grupos com superfícies tratadas (MN, MNSr e MNSr+). Porém, no grupo U o torque de remoção foi estatisticamente similar entre os dois períodos. Diferenças intergrupos significantes foram observadas entre o grupo U com os três grupos tratados (MN, MNSr e MNSr+), no período de 45 dias.

Figura 08 – Gráfico do Torque de remoção (N/cm²) avaliado nos diferentes grupos, nos períodos de 15 e 45 dias



*Diferença significativa entre os períodos ($p \leq 0,05$).

Diferença significativa entre os grupos em um mesmo período ($p \leq 0,05$).

Teste Two-Way ANOVA seguido de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de torque de remoção, em N/cm² dos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Torque de remoção (N/cm ²)	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	2,725±1,509 ^{Aa}	3,214±1,533 ^{Aa}	2,913±0,9553 ^{Aa}	4,600±1,115 ^{Aa}
45 dias	5,600±1,124 ^{Aa}	9,144±3,100 ^{Bb}	8,990±1,502 ^{Bb}	11,10±4,098 ^{Bb}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

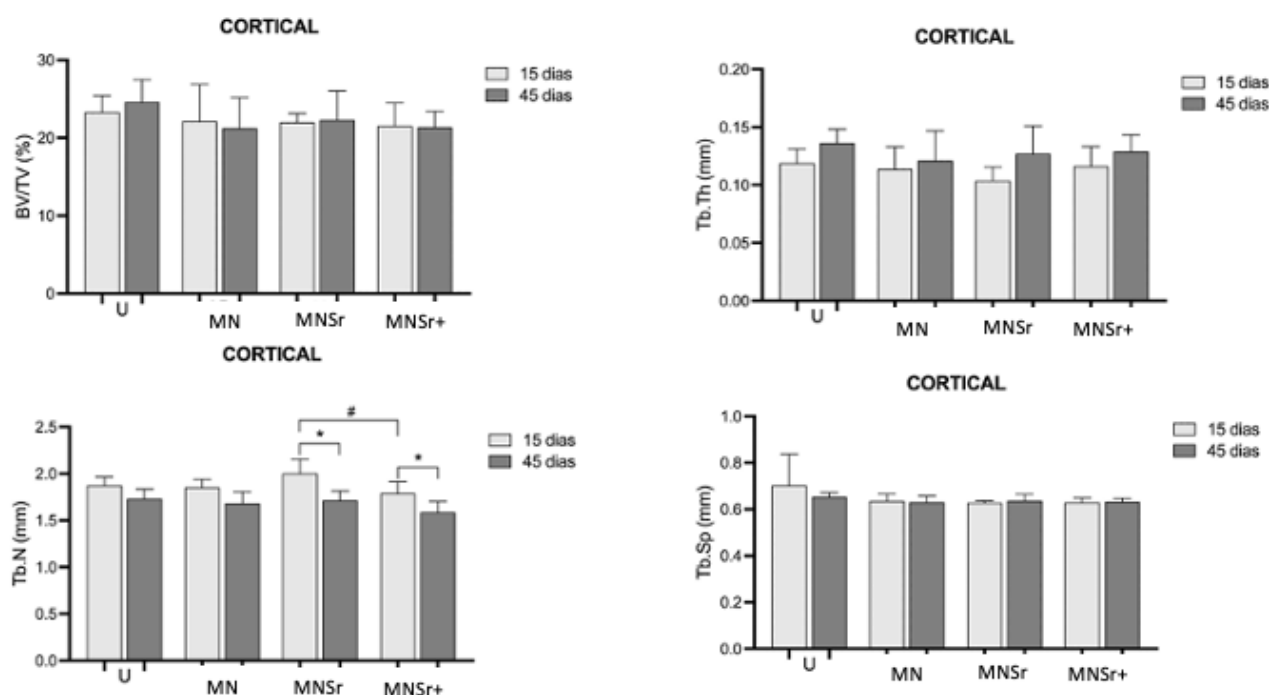
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise Óssea por Micro-CT

Nesta análise, o tecido ósseo ao redor do implante foi dividido em osso cortical (área mais coronal do implante) e medular (área mais central do implante). As medidas realizadas foram: BV/TV (*Bone Volume / Tissue Volume*) correspondendo ao volume de tecido mineralizado dentro da região de interesse (ROI), TB/Th (*Trabecular Thickness*) espessura das trabéculas ósseas, TB/N (*Trabecular Number*) – número de trabéculas e TB/Sp (*Trabecular Spacing*)– espaço entre as trabéculas.

5.2.1 Osso cortical

No ROI correspondente à região do osso cortical não houve diferença estatística para BV/TV, TB/Th e Tb.Sp; entretanto, para Tb.N houve diferença intragrupo, entre os períodos de 15 e 45 dias, para os grupos MNSr e MNSr+. Também foi observado diferenças intergrupo, entre os grupos MNSr e MNSr+, no período de 15 dias (Fig. 9 e Tabelas 02 a 05).

Figura 9 – Análise por Micro-CT do tecido ósseo na região correspondente ao osso cortical

#Diferença significativa entre os grupos em um mesmo período ($p \leq 0,05$).

Teste Two-Way

ANOVA seguido de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de volume ósseo e tecidual (BV/TV), em porcentagem na região cortical óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BV/TV (%) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
Períodos	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	23,28±2,134 ^{Aa}	22,14±4,709 ^{Aa}	21,98±1,123 ^{Aa}	21,53±2,950 ^{Aa}
45 dias	24,62±2,852 ^{Aa}	21,24±3,926 ^{Aa}	22,31±3,723 ^{Aa}	21,36±2,067 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de número de trabéculas ósseas (Tb.N), em milímetros na região cortical óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.N (mm) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
Períodos	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	1,875±0,09008 ^{Aa}	1,851±0,08790 ^{Aa}	2,003±0,1545 ^{Aa}	1,789±0,1256 ^{Aa}
45 dias	1,731±0,09992 ^{Aa}	1,683±0,1230 ^{Aa}	1,715±0,09981 ^{Ba}	1,586±0,1173 ^{Ba}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th), em milímetros na região cortical óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.Th (mm) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	0,1188±0,01246 ^{Aa}	0,1138±0,01923 ^{Aa}	0,1038±0,01188 ^{Aa}	0,1163±0,01685 ^{Aa}
45 dias	0,1363±0,01188 ^{Aa}	0,1211±0,02571 ^{Aa}	0,1270±0,02406 ^{Aa}	0,1289±0,01453 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de separação de trabéculas ósseas (Tb.Sp), em milímetros na região cortical óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.Sp (mm) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	0,7025±0,1347 ^{Aa}	0,6363±0,02973 ^{Aa}	0,6288±0,008345 ^{Aa}	0,6300±0,02000 ^{Aa}
45 dias	0,6538±0,01768 ^{Aa}	0,6311±0,02571 ^{Aa}	0,6370±0,02710 ^{Aa}	0,6333±0,01414 ^{Aa}

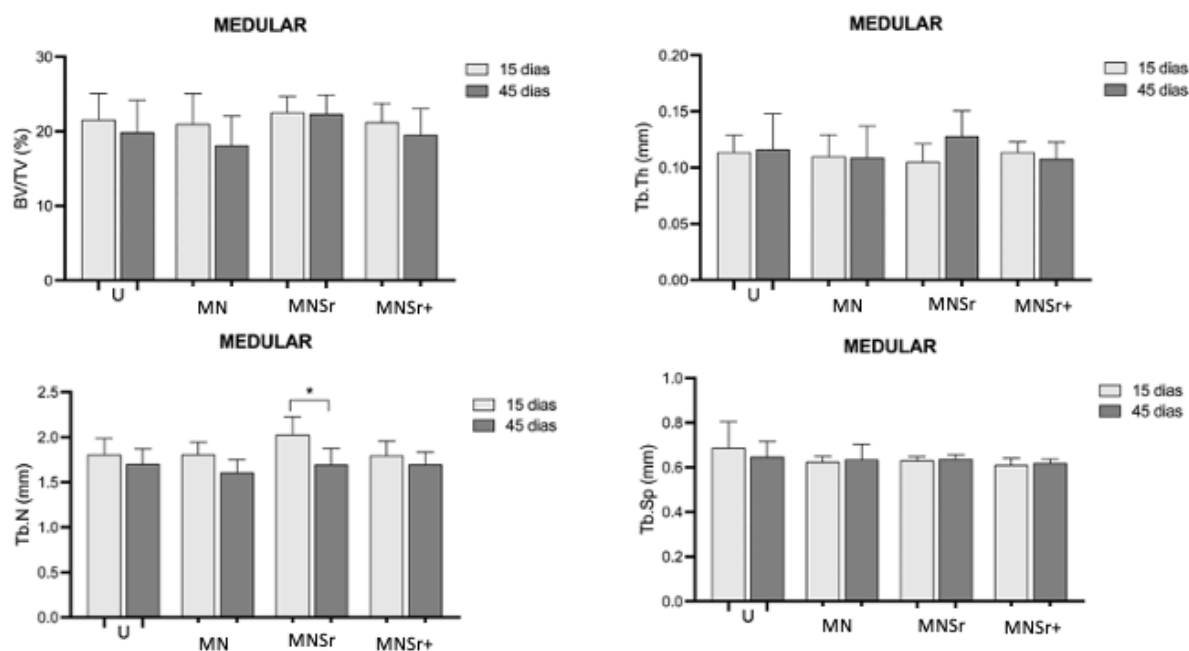
Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Espaço medular

No espaço medular não houve diferença estatística intergrupos, em ambos os períodos avaliados para todas as medidas. Porém, foi observada diferença intragrupo significativa para a medida Tb/N, no grupo MNSr, entre 15 e 45 dias (Fig. 10 e Tabelas 06 a 09).

Figura 10 – Análise por Micro-CT do tecido ósseo na região correspondente ao osso medular



*Diferença significativa entre os períodos de um mesmo grupo (teste T-student, $p \leq 0,05$). # Diferença significativa entre os grupos de um mesmo período (teste ANOVA seguido de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de volume ósseo e tecidual (BV/TV), em porcentagem na região medular óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BV/TV (%) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	21,60±3,463 ^{Aa}	21,02±4,033 ^{Aa}	22,53±2,162 ^{Aa}	21,20±2,554 ^{Aa}
45 dias	19,91±4,282 ^{Aa}	18,12±3,982 ^{Aa}	22,33±2,545 ^{Aa}	19,52±3,522 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de número de trabéculas ósseas (Tb.N), em milímetros na região medular óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.N (mm) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	1,809±0,1755 ^{Aa}	1,810±0,1345 ^{Aa}	2,030±0,1973 ^{Aa}	1,798±0,1586 ^{Aa}
45 dias	1,704±0,1705 ^{Aa}	1,611±0,1389 ^{Aa}	1,696±0,1809 ^{Ba}	1,697±0,1360 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th), em milímetros na região medular óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.Th (mm) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	0,1138±0,01506 ^{Aa}	0,1100±0,01927 ^{Aa}	0,1050±0,01604 ^{Aa}	0,1138±0,009161 ^{Aa}
45 dias	0,1163±0,03159 ^{Aa}	0,1089±0,02804 ^{Aa}	0,1280±0,02251 ^{Aa}	0,1078±0,01481 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 9. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de separação de trabéculas ósseas (Tb.Sp), em milímetros na região medular óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

Tb.Sp (mm) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
Períodos				
15 dias	0,6875±0,1162 ^{Aa}	0,6250±0,02449 ^{Aa}	0,6313±0,01642 ^{Aa}	0,6100±0,03024 ^{Aa}
45 dias	0,6475±0,06944 ^{Aa}	0,6356±0,06710 ^{Aa}	0,6380±0,01989 ^{Aa}	0,6200±0,01732 ^{Aa}

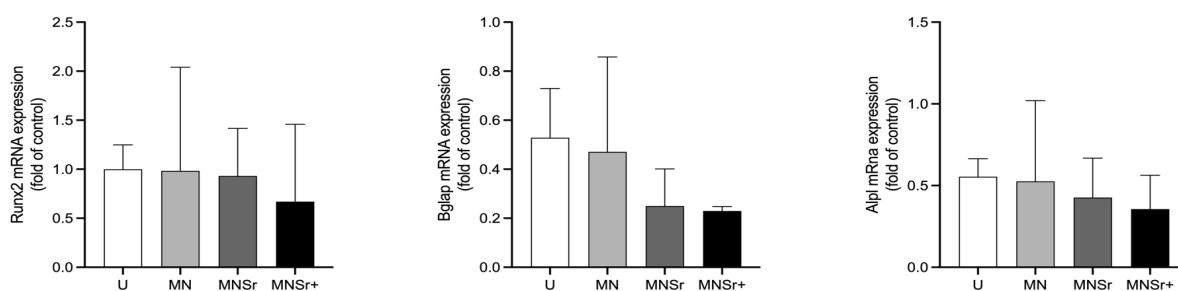
Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR

A Figura 11 apresenta os resultados da expressão gênica dos genes RUNX2, BGLAP e ALPL1. Em análise intergrupos, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as expressões dos genes supracitados.

Figura 11 - Fold-change, em relação ao grupo controle (U), da média e desvio padrão da expressão gênica dos genes alvos RUNX2, BGLAP e ALPL nos diferentes grupos tratados



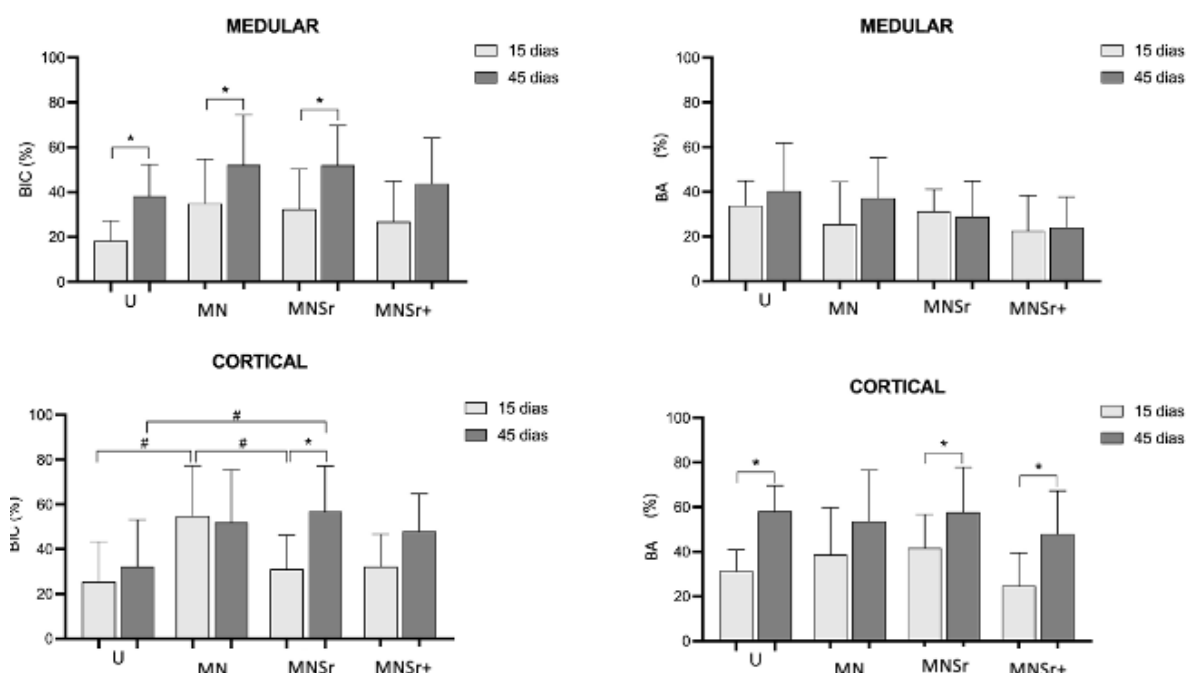
Anova-two way ($p > 0.05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Análise Histomorfométrica pelo Sistema EXAKT

Para a medida BIC, foi observado no espaço medular diferença intragrupo significativa para os grupos U, MN e MNSr, entre os períodos de 15 e 45 dias. Esta mesma medida, no osso cortical, apresentou diferença intragrupo apenas para o grupo MNSr. Diferenças intergrupos foram observadas para BIC entre o grupo MN e os grupos U e MNSr (15 dias), e entre o grupo MNSr e U (45 dias). Já para a medida BA, observou-se que no osso medular não houve diferença estatística entre os grupos; entretanto, no osso cortical, houve diferença intragrupo nos grupos U, MNSr e MNSr+ (entre 15 e 45 dias), (Fig 12 e Tabelas 10-13), Imagens histológicas Figuras 13-16.

Figura 12– Análise histométrica, compreendendo as medidas BIC (Bone Implant Contact) e BA (Bone Area) nas regiões correspondentes aos ossos medular e cortical



#Diferença significativa entre os grupos em um mesmo período ($p \leq 0,05$). Teste Two-Way ANOVA seguido de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 10. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de contato osso-implante (BIC), em porcentagem na região cortical óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BIC (%) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	25,40±17,98 ^{Aa}	54,77±22,45 ^{Ab}	31,04±15,24 ^{Aa}	32,16±14,57 ^{Aab}
45 dias	32,12±20,95 ^{Aa}	51,92±23,49 ^{Aab}	56,85±20,26 ^{Ba}	48,07±16,69 ^{Aab}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 11. Médias e desvio-padrão (DP) da análise de contato osso-implante (BIC), em porcentagem na região medular óssea nos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BIC (%) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	18,35±8,852 ^{Aa}	34,88±19,79 ^{Aa}	32,39±17,89 ^{Aa}	26,84±18,01 ^{Aa}
45 dias	38,13±14,16 ^{Ba}	52,06±22,33 ^{Ba}	52,00±17,61 ^{Ba}	43,80±20,29 ^{Aa}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 12 – Médias e desvio-padrão (DP) da análise de ocupação da fração de área óssea (BA), em porcentagem na região cortical óssea dos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BA (%) CORTICAL	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	31,42±9,424 ^{Aa}	38,65±21,04 ^{Aa}	41,74±15,01 ^{Aa}	24,72±14,81 ^{Aa}
45 dias	58,22±11,39 ^{Ba}	53,71±22,86 ^{Ba}	57,70±20,16 ^{Ba}	47,94±19,34 ^{Ba}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

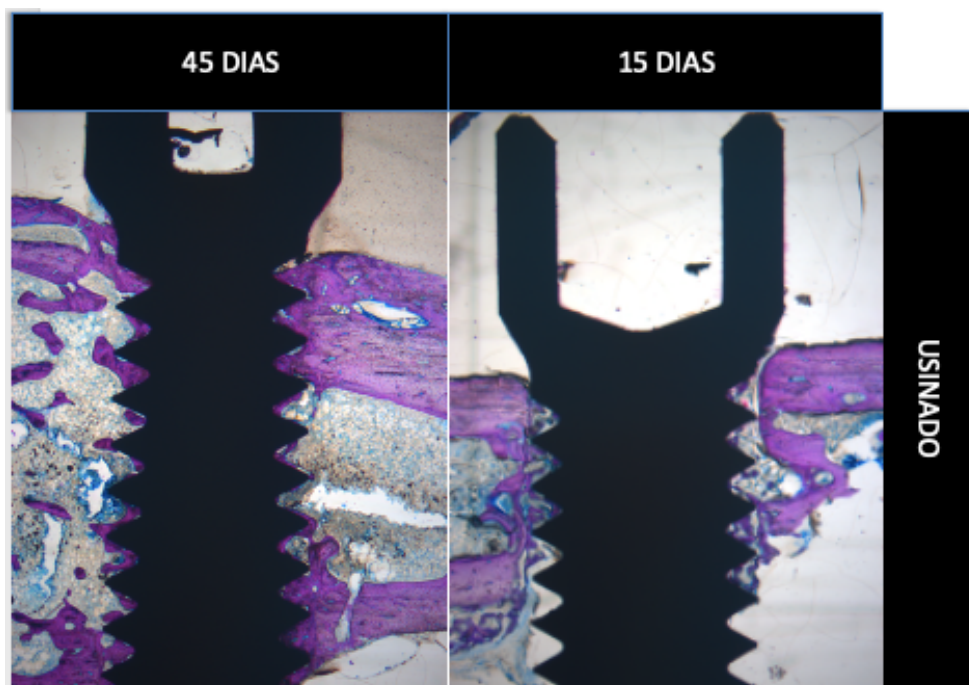
Tabela 13 – Médias e desvio-padrão (DP) da análise de ocupação da fração de área óssea (BA), em porcentagem na região medular óssea dos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos períodos de 15 e 45 dias.

BA (%) MEDULAR	Tratamentos de superfície			
	U (média±DP)	MN	MNSr	MNSr+
15 dias	33,83±11,10 ^{Aa}	25,44±18,97 ^{Aa}	31,21±9,871 ^{Aa}	22,47±15,86 ^{Aa}
45 dias	40,38±21,46 ^{Ba}	37,19±18,10 ^{Ba}	28,90±15,94 ^{Ba}	23,99±13,68 ^{Ba}

Letras sobrescritas distintas (maiúsculas comparam os períodos na coluna, minúsculas comparam os tratamentos de superfície na linha) indicam diferença estatística ao teste de Two-Way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

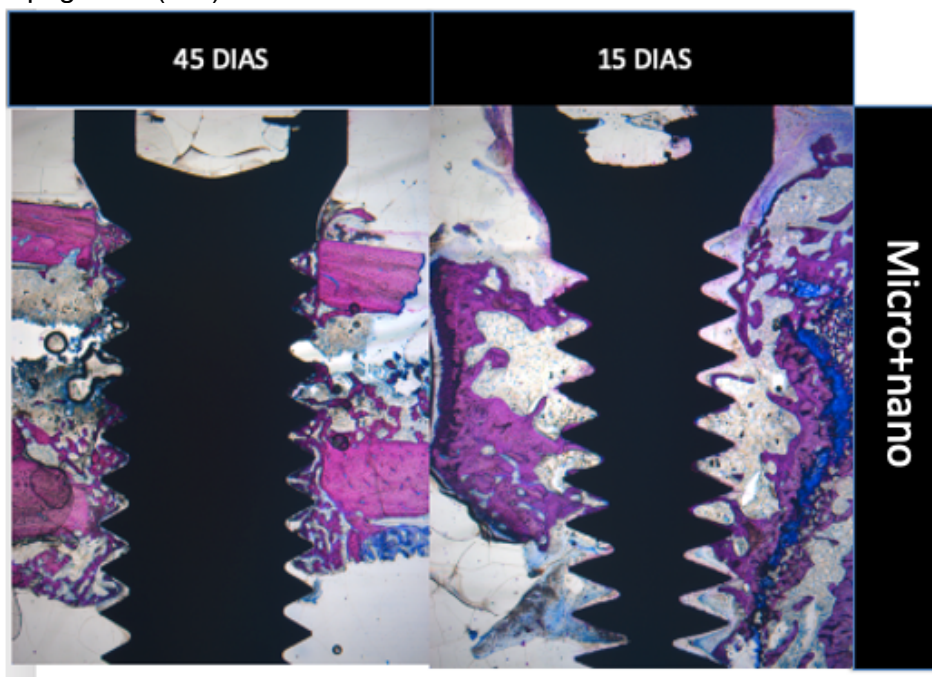
Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 – Corte histológico em aumento de 2,5x representando o grupo Usinado em 15 e 45 dias



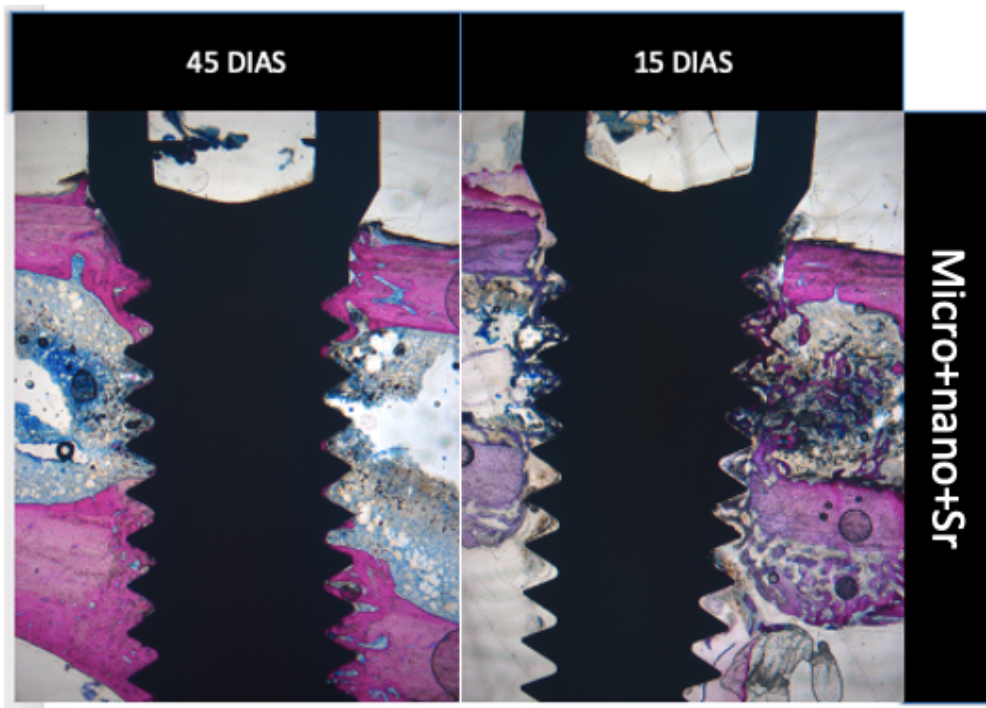
Fonte: Elaboração e acervo da própria pesquisa.

Figura 14 – Corte histológico em aumento de 2,5x representando o grupo Micro Nano topográfico (MN) em 15 e 45 dias



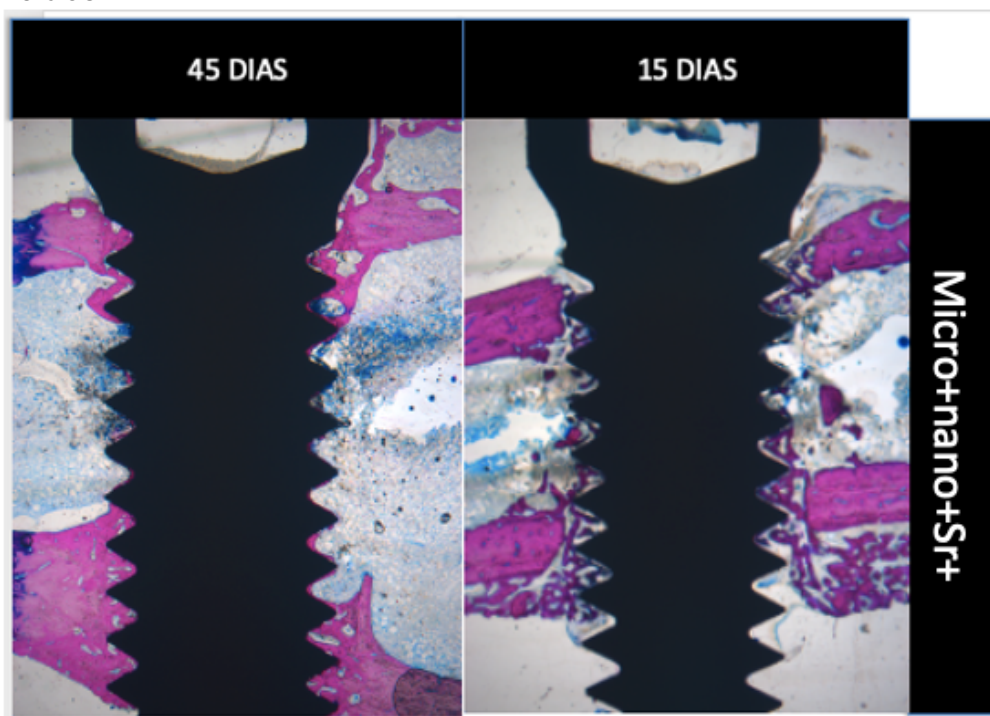
Fonte: Elaboração e acervo da própria pesquisa.

Figura 15 – Corte histológico em aumento de 2,5x representando o grupo MNSr em 15 e 45 dias



Fonte: Elaboração e acervo da própria pesquisa.

Figura 16 – Corte histológico em aumento de 2,5x representando o grupo MNSr+ em 15 e 45 dias

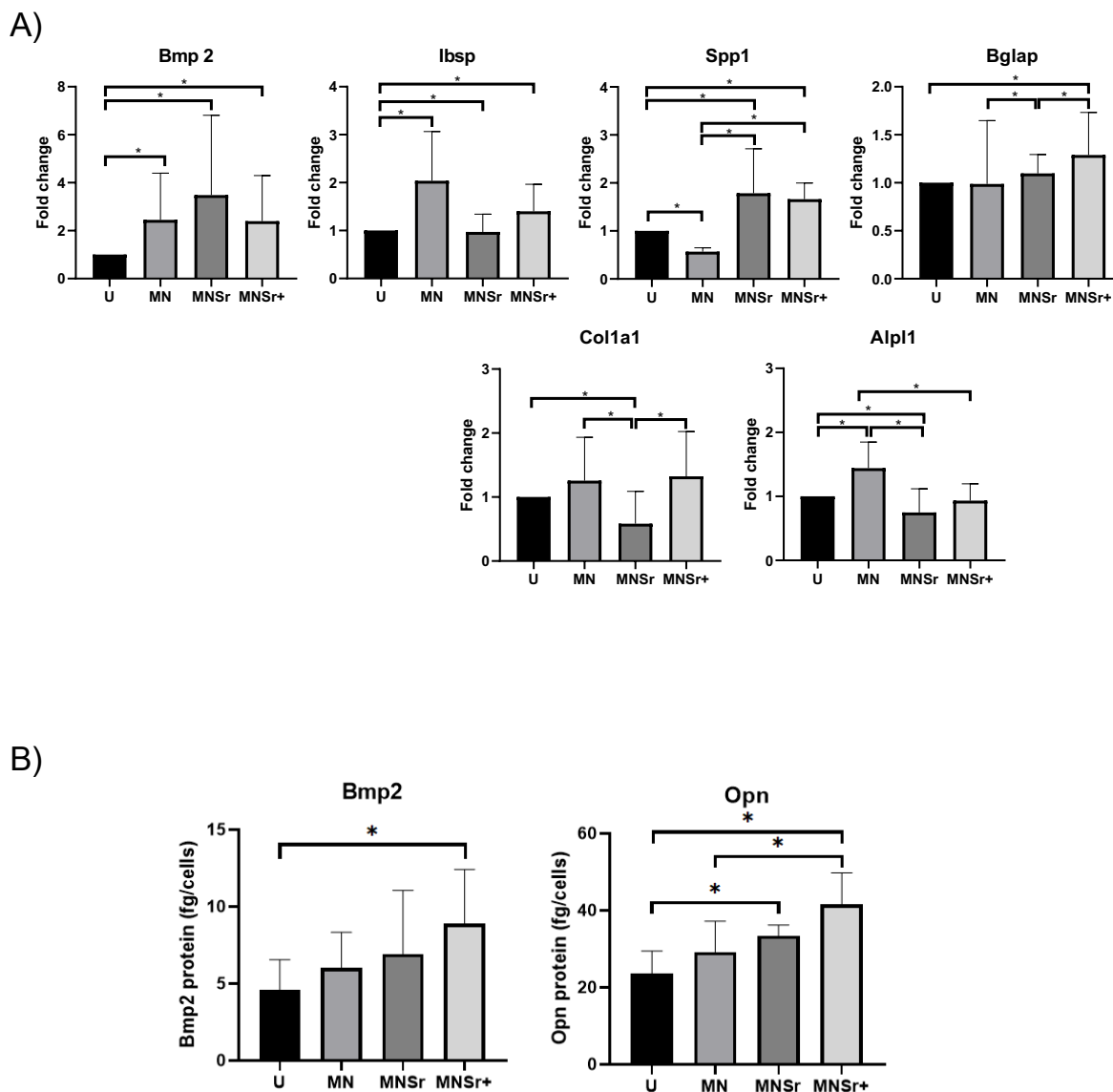


Fonte: Elaboração e acervo da própria pesquisa.

5.5 Análise Complementar *In Vitro*: Expressão Gênica e Produção de Proteínas RT-qPCR e Elisa

Diferenças na expressão de RNA de proteínas classicamente relacionadas à osteogênese foram observadas entre os tratamentos para todas as moléculas analisadas aos sete dias de cultivo celular, conforme mostrado na Figura 17. Na avaliação das proteínas aos 7 dias de cultivo, os resultados do Elisa normalizado de acordo com o número de células mostrou maior expressão de Bmp2 no grupo MNSr+, e de Opn em ambos os grupos dopados com Sr^{2+} em comparação com o controle (Figura 17B)

Figura 17 - A) Gráficos da expressão de genes relacionados à via osteogênica avaliados no intervalo de tempo de 7 dias. **B)** Teste ELISA de meio de cultura coletado de sobrenadantes celulares após 7 dias de cultivo celular



A concentração foi expressa em pg/mL e normalizada de acordo com o número de células (fg/células).

* indica a diferença estatística entre os grupos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

As análises *in vitro* prévias a este estudo e que cancelaram esse projeto para avançar na análise *in vivo*, demonstraram que o tratamento alcalino proporcionou maior molhabilidade e aumento da energia de superfície, o que favorece a osteogênese celular. O tratamento favoreceu a viabilidade celular de células MC3T3-E1, enfatizando aspectos positivos dessas superfícies. Para incorporação do estrôncio, o método hidrotermal se apresentou como uma alternativa simples e viável, favorecendo a resposta, proliferação e viabilidade celular⁹¹⁻⁹⁵.

Um grande número de pesquisas relatou que superfícies de titânio modificadas com topografias em micro ou nano-escala poderiam mediar a resposta celular e melhorar a formação óssea⁹³⁻⁹⁵. As modificações topográficas em nano-escala em superfícies de implantes de titânio aparafusados podem melhorar a osseointegração precoce por intermédio da regulação de alguns eventos biológicos, como adsorção de proteínas, adesão celular e motilidade celular⁹⁶⁻⁹⁸.

A incorporação do estrôncio pelo método hidrotermal é bastante descrita na literatura, se demonstrando uma técnica simples e de custo baixo⁹⁹⁻¹⁰¹.

No presente estudo utilizou-se tíbias bilaterais de ratos da linhagem Rattus Norvegicus, variação albinus, Holtzman, machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal entre 300 e 350 gramas, devido a facilidade no manuseio, custos e possível implantação de implantes 2.2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento.

Os resultados da análise de torque de remoção demonstraram maior torque em 45 dias comparado a 15 dias em todos os grupos com superfícies tratadas, sugerindo maior osseointegração no período tardio, beneficiada provavelmente pela textura de superfície mais favorável nos grupos tratados, além da adição do estrôncio à superfície (MNSr e MNSr+). Um estudo que avaliou em duas e oito semanas a cicatrização de implantes com tratamento com estrôncio (SLA-Sr) e utilizando superfícies moderadamente rugosas, houve aumento significativo nos valores do torque de remoção ($p > 0,05$), além disso demonstraram uma maior área óssea¹⁰².

Na análise quantitativa e qualitativa do tecido ósseo, realizada por Micro-CT, os grupos não apresentaram diferença estatística nas áreas do espaço medular e do osso cortical (BV/TV, TB/Th e TB/Sp). Porém, esta análise possui limitações técnicas devido à alta densidade do metal, que pode produzir artefato técnico conhecido como

beam hardening (endurecimento do feixe de raio x) interferindo na análise do tecido ósseo ao redor dos implantes^{103,104}. Esta limitação pode ter dificultado a identificação de diferenças significantes tanto na quantidade quanto qualidade do osso ao redor dos implantes. Entretanto, na área do osso cortical observou-se diferença estatística na comparação intragrupo para Tb/N, nas duas superfícies tratadas com estrôncio (MNSr e MNSr+), havendo uma redução dos valores para o período de 45 dias, em relação ao período inicial de 15 dias. Isto pode ser justificado por um aumento na formação óssea e união das trabéculas, tornando o osso mais denso e com menor número de trabéculas detectadas por micro-CT. Esta interpretação, em parte, é confirmada pela tendência de maior espessura trabecular (Tb/Th) no período de 45 dias, observado para todos os grupos. Já no espaço medular, houve diminuição de BV/Tv nos períodos experimentais (15 e 45 dias), TB/Sp se manteve estável e um ligeiro aumento das trabéculas ósseas (TB/Th). A literatura apresenta diversos estudos utilizando essa técnica e tendo resultados positivos em relação a implantes dentários^{103,104}.

Na análise histométrica pelo sistema EXAKT, a medida BIC no espaço medular apresentou diferença estatística intragrupo, entre os períodos de 15 e 45 dias, demonstrando maior formação óssea no período experimental tardio. Ainda no espaço medular, a medida BA não apresentou diferença estatística entre grupos e períodos. Já na área do osso cortical para o BIC houve diferença estatística intergrupos, onde o grupo MN apresentou maior BIC aos 15 dias, quando comparado aos grupos U e MNSr. Também o grupo MNSr apresentou maior BIC aos 45 dias, quando comparado ao grupo U. Estas diferenças demonstram efeitos positivos dos tratamentos, sugerindo estímulo na osseointegração. Na área do osso cortical, a medida BA apresentou diferença estatística intragrupo entre os períodos experimentais (15 e 45 dias) para os grupos U, MNSr e MNSr+. A literatura correlata trás duas revisões sistemáticas sobre tratamento de superfície com estrôncio que analisa BIC; Em uma primeira, com um total de onze estudos, nove deles relataram que implantes com revestimento de estrôncio apresentaram maior BIC e melhoraram a osseointegração dos implantes⁴⁰; Em uma segunda revisão sistemática, onde se avaliou a suplementação via oral de estrôncio com animais em condições osteoporóticas, sendo elegíveis 789 implantes, os resultados mostraram um aumento significativo do BIC (17,1%) e da área óssea (13,5%), otimizando a resistência mecânica do osso recém-formado⁸¹.

Os resultados do PCR em tempo real não apresentaram diferença estatística entre os grupos, fato que pode ser justificado pelo período da análise (15 dias). Este pode ser considerado um período tardio quando se pretende avaliar diferenças na expressão gênica na fase inicial de diferenciação celular e formação óssea ao redor do implante. Portanto, estudos em períodos mais curtos teriam maior potencial de demonstrar diferenças entre as superfícies tratadas. Neste sentido, um estudo complementar foi realizado *in vitro* utilizando discos com os mesmos tratamentos de superfícies descritos no estudo em período de análise de sete dias (7), tanto para expressão gênica quanto para produção de proteínas relacionadas à osteogênese. Neste estudo destacaram-se as proteínas BMP2 e osteopontina (Spp1/OPN) que se demonstraram significativamente com expressão gênica e produção proteica maior nos grupos com superfícies tratadas, com destaque aos grupos com estrôncio. A BMP2 é uma proteína de extrema importância para o processo cicatricial e de remodelação óssea pós-implante, sendo ela encontrada na matriz óssea e possuindo a capacidade de estimular células mesenquimais indiferenciadas a formar tecido ósseo^{110,111}. A osteopontina é uma das proteínas não colagenosas presentes na matriz óssea, estudos demonstram que a OPN está envolvida em atividades biológicas, tais como: proliferação, migração e adesão de células relacionadas ao osso, incluindo células da medula óssea, osteoclastos e osteoblastos, e está ligada e expressa pela integrina correspondente na superfície celular, tornando-se de extrema importância na remodelação óssea^{112,113}. Estudos demonstram que a deposição de OPN aumenta a osteogênese^{114,115}. Assim, os resultados demonstram a capacidade de biomineralização dos implantes de superfície tratadas com estrôncio.

Os resultados encontrados e discutidos evidenciam a relevância da presente pesquisa que busca desenvolver materiais que diminuam o intervalo de osseointegração trazendo novas possibilidades de dopagem e aditivos de implantes dentários, na busca por ampliar e aprofundar o conhecimento sobre a temática para futuras e novas possibilidades de implantes desses materiais, visando benefícios clínicos e estéticos, contribuindo assim com avanços técnicos-científicos nesta área do conhecimento. Estudos pré-clínicos e clínicos complementares são necessários se confirmar os reais benefícios das superfícies propostas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que os tratamentos de superfície estudados e adição de estrôncio são promissores e superiores à superfície usinada em algumas análises. Porém, nas condições estudadas, foram similares entre si. Assim, esta pesquisa aponta a necessidade de continuidade e avanço de estudos translacionais, visando melhor esclarecer os benefícios clínicos das superfícies estudadas à implantodontia.

REFERÊNCIAS

- 1 Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10(6): 387-416.
- 2 Silva BCS, Carvalho PSP, Vedovato E, Bassi APF, Conforte JJ, Ponzoni D. Estudo retrospectivo da taxa de sobrevivência de implantes instalados por profissionais com diferentes graus de experiência na implantodontia. *Rev Faculd Odontol.* 2015; 20(3): 295-301.
- 3 Sharkey PF, Lichstein PM, Shen C, Tokarski AT, Parvizi J. Why are total knee arthroplasties failing today--has anything changed after 10 years? *J Arthroplasty.* 2014; 29(9): 1774-8.
- 4 Bandyopadhyay A, Shivaram A, Mitra I, Bose S. Electrically polarized TiO₂ nanotubes on Ti implants to enhance early-stage osseointegration. *Acta Biomater.* 2019; 96: 686-93.
5. Karazisis D, Ballo AM, Petronis S, Agheli H, Emanuelsson L, Thomsen P, Omar O. The role of well-defined nanotopography of titanium implants on osseointegration: cellular and molecular events in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 1367-82.
- 6 Anil S, Anand PS, Alghamdi H, Jansen JA. Dental implant surface enhancement and osseointegration. *Implant dent.* 2011; 82-108.
- 7 Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials.* 2004; 25(7-8): 1429-38.
- 8 Niesche R, Haase M. Emotions and ethics: a foucauldian framework for becoming an ethical educator. *Educ Philos Theory.* 2012; 44(3): 276-88.
- 9 Sartoretto SC, Alves AT, Resende RF, Calasans-Maia J, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(3): 279-87.
- 10 Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. The effect of titanium plasma-sprayed implants on trabecular bone healing in the goat. *Biomaterials.* 1998; 19(11-12): 1093-9.
- 11 Berglundh T, Gotfredsen K, Zitzmann NU, Lang NP, Lindhe J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18(5): 655-61
- 12 Christenson E, Anseth KS, van den Beucken JJ, Chan CK, Batur Ercan, Jansen JA, et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J of Orthop Res.* 2007; 25(1): 11-22.
- 13 Sato M, Aslani A, Sambito MA, Kalkhoran NM, Slamovich EB, Webster TJ. Nanocrystalline hydroxyapatite/titania coatings on titanium improves osteoblast adhesion. *J Biomed Mat Res.* 2008; 84(1): 265-72

14. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater.* 2018; 34(1): 40-57.
15. Alves DCL. The evolution of oral rehabilitation through implantodontics. *Health Soc.* 2021; 1(5): 208-34.
16. Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(6): 1161-75.
17. Wang X, Li R, Li Z, Xiao R, Chen XB, Zhang T. Design and preparation of nanoporous Ag–Cu alloys by dealloying Mg–(Ag,Cu)–Y metallic glasses for antibacterial applications. *J of Mat Chem B.* 2019; 7, 4169-76.
18. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone.* 2001; 28(4): 446-53.
19. Zeng J, Guo J, Sun Z, Deng F, Ning C, Xie Y. Osteoblastic and anti-osteoclastic activities of strontium-substituted silicocarnotite ceramics: In vitro and in vivo studies. *Bioactive Materials.* 2020; 5(3): 435–46.
20. Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells.* 2011; 29(6): 981-91.
21. Mendonça TA. Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*) [dissertação]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo. 2005.
22. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001; 262(4): 398-419.
23. Feller L, Chandran R, Khammissa RA, Meyerov R, Jadwat Y, Bouckaert M, Schechter I, Lemmer J. Osseointegration: biological events in relation to characteristics of the implant surface. *SADJ.* 2014; 69(3): 112-7
24. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20 (4): 172-84.
25. Karazisis D, Ballo AM, Petronis S, Agheli H, Emanuelsson L, Thomsen P, Omar O. The role of well-defined nanotopography of titanium implants on osseointegration: cellular and molecular events in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2016; 1 (11):1367-82.
26. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, Del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J Investig Clin Dent.* 2018; 9(4).
27. Alenezi A, Galli S, Atefyekta S, Andersson M, Wennerberg A. Osseointegration effects of local release of strontium ranelate from implant surfaces in rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2019; 30(10):116.
28. Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzaglia G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2010; 365(1-3): 222–9.
29. Nakae H, Yoshida M, Yokota M. Effects of roughness pitch of surfaces on their wettability. *J of Mat Scien.* 2005; 40(9-10): 2287–93.

- 30 Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mat Sci and Eng: C*. 2003; 23(4): 551–60.
- 31 Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Bignozzi CA, Massari L, Brunelli G, Carinci F. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dent Mater*. 2008; 24(3): 357-61.
- 32 Assal PA. The osseointegration of zirconia dental implants. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2013; 123(7-8): 644-54
- 33 Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface*. 2010; 6 (7): 515-27.
- 34 Silva FL, Rodrigues F, Pamato S, Pereira JR. Tratamento de superfície em implantes dentários: uma revisão de literatura. *RFO UPF*. 2016; 21(1): 136–42.
- 35 Takadama H, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal. *J Biomed Mater Res*. 2001; 55(2): 185-93.
- 36 Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16(6): 650-6.
- 37 Sul YT, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(5): 521-6.
- 38 Bajgai MP, Parajuli DC, Park SJ, Chu KH, Kang HS, Kim HY. In vitro bioactivity of sol-gel-derived hydroxyapatite particulate nanofiber modified titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(2): 685-94.
- 39 Mittal M, Nath S, Prakash S, Characterization of Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings on AISI 316L SS and Titanium Substrate and their Corrosion Behavior in Simulated Body Fluid. *J of Min and Mat Charac and Eng*. 2011; 10(11): 1041-49
- 40 Gregori D, Giacobelli G, Minto C, Barbetta B, Gualtieri F, Azzolina D, et al. Association of Pharmacological Treatments With Long-term Pain Control in Patients With Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2018; 320(24): 2564-79.
- 41 Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(5): 662-8.
- 42 Schlee M, Pradies G, Mehmke WU, Beneytout A, Stamm M, Meda RG, et al. Prospective, Multicenter Evaluation of Trabecular Metal-Enhanced Titanium Dental Implants Placed in Routine Dental Practices: 1-Year Interim Report From the Development Period (2010 to 2011). *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17(6): 1141-53.

- 43 Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 1995; 29(3): 389-401.
- 44 Ko HC, Han JS, Bächle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dent Mater.* 2007; 23(11): 1349-55.
- 45 Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, Kübler NR, Meyer U. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med.* 2008; 8(4): 29.
- 46 Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials.* 2009; 30(5): 736-42.
- 47 Isaac J, Galtayries A, Kizuki T, Kokubo T, Berda A, Sautier JM. Bioengineered titanium surfaces affect the gene-expression and phenotypic response of osteoprogenitor cells derived from mouse calvarial bones. *Eur Cell Mater.* 2010; 28(20): 178-96.
- 48 Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 791725.
- 49 Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32(3): 409-17.
- 50 Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res.* 2000; 52(4): 652-61.
- 51 Xing H, Komasa S, Taguchi Y, Sekino T, Okazaki J. Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 1741-55.
- 52 Sumita M, Hanawa T, Teoh SH. Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials—review. *Mat Sci and Eng.* 2004.
- 53 Ehrlich H. *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin.* 1st ed. 2019 edition. Amazon. Cham: Springer. 2019.
- 54 Garcia CC, Cere C, Silva D. Bioactive Coatings Prepared by Sol–Gel on Stainless Steel 316L. *Journal of Non-Cryst. Solids.* 2004; 348: 218-24
- 55 Sul YT, Kwon DH, Kang BS, Oh SJ, Johansson C. Experimental evidence for interfacial biochemical bonding in osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24:8-19.
- 56 Sul YT, Towse R. The osseointegration properties of titanium implants with hydroxyapatite submicron-scale features in the rabbit tibia. *Int J Periodontics Rest. Dent.* 2014; 34(1): 18-25.

- 57 Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, Stevens MM. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials*. 2010; 31(14): 3949-56.
- 58 Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells*. 2011; 29(6): 981-91.
- 59 Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, Laurent-Maquin, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomater*. 2011; 7(6): 2593-603.
- 60 Cruz MAE, Tovani CB, Favarin BZ, Soares MPR, Fukada SY, Ciancaglini P, et al. Synthesis of Sr–morin complex and its *in vitro* response: decrease in osteoclast differentiation while sustaining osteoblast mineralization ability. *J. Mater. Chem. B*. 2019; 7: 823-29
- 61 Llinas P, Masella M, Stigbrand T, Ménez A, Stura EA, Le Du MH. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones. *Protein Sci*. 2006; 15(7): 1691-700
- 62 Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*. 1996; 18(6): 517-23.
- 63 Marie PJ. Strontium as therapy for osteoporosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(6): 633-6.
- 64 Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69(3): 121-9.
- 65 Alenezi A, Galli S, Atefyekta S, Andersson M, Wennerberg A. Osseointegration effects of local release of strontium ranelate from implant surfaces in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2019; 30(10): 116.
- 66 Coulombe J, Faure H, Robin B, Ruat M. In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323(4): 1184-90.
- 67 Capuccini C, Torricelli P, Sima F, Boanini E, Ristoscu C, Bracci B, Socol G, Fini M, Mihailescu IN, Bigi A. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater*. 2008; 4(6): 1885-93.
- 68 Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008; 42(1): 129-38.
- 69 Oliveira, NTC., Guastaldi, AC Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti–Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomat*. 2009; 5(1): 399-405.
- 70 Kung KC, Lee TM, Lui TS. Bioactivity and corrosion properties of novel coatings containing strontium by micro-arc oxidation. *J. of Alloys and Comp*. 2010; 508(2): 384-90.
- 71 Huang Y, Haixia Q, Xiaofeng N, Zhang X, Song G, Zhiwei X. Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited

- hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. *Surf. and Coatings Tec.* 2016; 291: 205.
- 72 Luz AP, Ribeiro S, Pandolfelli VC. Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica.* 2008; 54: 174-183.
 - 73 Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale.* 2011;3(2): 335-53.
 - 74 Andersen OZ, Offermanns V, Sillassen M, Almtoft KP, Andersen IH, Sørensen S, et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. *Biomater.* 2013; 34(24): 5883-90.
 - 75 Zhang W, Shen Y, Pan H, Lin K, Liu X, Darvell BW, Lu WW, Chang J, Deng L, Wang D, Huang W. Effects of strontium in modified biomaterials. *Acta Biomater.* 2011; 7(2): 800-8.
 - 76 Oliveira NT, Guastaldi AC. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009; 5(1): 399-405
 - 77 Chen X, Chen Y, Shen J, Xu J, Zhu L, Gu X, He F, Wang H. Positive modulation of osteogenesis on a titanium oxide surface incorporating strontium oxide: An in vitro and in vivo study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 99: 710-18.
 - 78 Lin G, Zhou C, Lin M, Xu A, He F. Strontium-incorporated titanium implant surface treated by hydrothermal reactions promotes early bone osseointegration in osteoporotic rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2019; 30(8): 777-90.
 - 79 Xu Y, Zhang L, Xu J, Li J, Wang H, He F. Strontium-incorporated titanium implant surfaces treated by hydrothermal treatment enhance rapid osseointegration in diabetes: A preclinical vivo experimental study. *Clin Oral Implants Res.* 2021; 32(11): 1366-83
 - 80 Arnáez G, Cerqueira A, Romero-Gavilán F, Elortza F., Azkargorta M, Lloro I, et al. Development and characterisation of strontium-doped sol-gel coatings to optimise the initial bone regeneration processes. *Mat Today Com.* 2022; 33: 104674
 - 81 Lu W, Zhou Y, Yang H, Cheng Z, He F. Efficacy of strontium supplementation on implant osseointegration under osteoporotic conditions: A systematic review. *J Prosthet Dent.* 2022; 128(3): 341-49.
 - 82 Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci.* 2007; 53(1-2): 25-35.
 - 83 Li Y, Wang W, Yu F, Wang D, Guan S, Li Y, Qi M. Characterization and cytocompatibility of hierarchical porous TiO₂ coatings incorporated with calcium and strontium by one-step micro-arc oxidation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020; 109: 110610.
 - 84 Mumith A, Cheong VS, Fromme P, Coathup MJ, Blunn GW. The effect of strontium and silicon substituted hydroxyapatite electrochemical coatings on bone ingrowth and osseointegration of selective laser sintered porous metal implants. *PLoS One.* 2020; 15(1).

- 85 Zhao B, Li X, Xu H, Jiang Y, Wang D, Liu R. Influence of Simvastatin-Strontium-Hydroxyapatite Coated Implant Formed by Micro-Arc Oxidation and Immersion Method on Osteointegration in Osteoporotic Rabbits. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:1797-807.
- 86 Huanhuan J, Pengjie H, Sheng X, Binchen W, Li S. The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration. *J Biomater Appl*. 2017; 32(5): 561-69.
- 87 Offermanns V, Andersen OZ, Riede G, Sillassen M, Jeppesen CS, Almtoft KP, et al. Effect of strontium surface-functionalized implants on early and late osseointegration: A histological, spectrometric and tomographic evaluation. *Acta Biomater*. 2018; 69: 385-94.
- 88 Park JW. Positive regulation of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated osteoblast functions by strontium modification of an SLA titanium implant surface. *J Biomater Appl*. 2020; 34(6): 802-811.
- 89 Zhao Q, Yi L, Jiang L, Ma Y, Lin H, Dong J. Surface functionalization of titanium with zinc/strontium-doped titanium dioxide microporous coating via microarc oxidation. *Nanomedicine*. 2019;16:149-161
- 90 Florian F. Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de titânio-molibdênio. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP. 2018.
- 91 Matos FG, Santana LCL, Cominotte MA, da Silva FS, Vaz LG, de Oliveira DP, Cirelli JA. Strontium-loaded titanium-15molybdenum surface improves physicochemical and biological properties in vitro. *Biomed Phys Eng Express*. 2022; 8(4).
- 92 Cominotte MA. Avaliação de diferentes tratamentos de superfícies de titânio comercialmente puro e titânio-6Al-4V. Análises físicas, químicas e biológicas in vitro [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
- 93 Cohen DJ, Cheng A, Sahingur K, Clohessy RM, Hopkins LB, Boyan BD, Schwartz Z. Performance of laser sintered Ti-6Al-4V implants with bone-inspired porosity and micro/nanoscale surface roughness in the rabbit femur. *Biomed Mater*. 2017; 12 (2): 025021.
- 94 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): 240-7.
- 95 Li K, Hu D, Xie Y, Huang L, Zheng X. Sr-doped nanowire modification of Ca-Si-based coatings for improved osteogenic activities and reduced inflammatory reactions. *Nanotechnology*. 2018; 23; 29(8): 084001
- 96 Karazisis, D, Petronis, S, Agheli, H, Emanuelsson, L, Norlindh, B, Johansson, A., et al. The influence of controlled surface nanotopography on the early biological events of osseointegration. *Acta Biomater*. 2017; 53: 559-71.
- 97 Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomater*. 2008; 29(28): 3822-35.

- 98 Souza JCM, Sordi MB, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, Aparicio C, Cooper LF. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomater.* 2019; 94: 112-31
- 99 Xu Y, Zhang L, Xu J, Li J, Wang H, He F. Strontium-incorporated titanium implant surfaces treated by hydrothermal treatment enhance rapid osseointegration in diabetes: A preclinical vivo experimental study. *Clin Oral Implants Res.* 2021; 32(11): 1366-83.
- 100 Moloodi A, Toraby H, Kahrobaee S, Razavi MK, Salehi A. Evaluation of fluorohydroxyapatite/strontium coating on titanium implants fabricated by hydrothermal treatment. *Prog Biomater.* 2021; 10(3): 185-94.
- 101 Wu, YF, Lin, GF, Zhang LF, He FM. Biomechanical and Morphometric Evaluation of a Strontium-Incorporated Implant and Four Commercially Available Implants: A Study in Rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 2020; 35(3).
- 102 Huanhuan J, Pengjie H, Sheng X, Binchen W, Li S. The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration. *J Biomater Appl.* 2017; 32(5): 561-69.
- 103 Draenert FG, Coppenrath E, Herzog P, Müller S, Mueller-Lisse UG. Beam hardening artefacts occur in dental implant scans with the NewTom cone beam CT but not with the dental 4-row multidetector CT. *Dentomaxillofac. Radiol.* 2007; 36(4): 198-203.
- 104 Park HS, Chung YE, Seo JK. Computed tomographic beam-hardening artefacts: mathematical characterization and analysis. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2015; 373(2043): 20140388.
- 105 Marie PJ. Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporos Int.* 2008; 19(12):1813
- 106 Olszta, MJ, Cheng, X, Jee, SS, Kumar, R, Kim, YY, Kaufman, MJ, et al.. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Scien. and Eng.: R: Reports.* 2007; 58(3-5): 77-116.
- 107 Elias CN, Lima JHC, Valiev R, Meyers MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. *Jom,* 2008; 60: 46-9.
- 108 Civantos A, Martínez-Campos E, Ramos V, Elvira C, Gallardo A, Abarrategi A. Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017; 3(7): 1245-61.
- 109 Geetha, M, Singh, AK, Asokamani, R, Gogia, AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—A review. *Progress in materials science,* 2009; 54 (3): 397-425.
- 110 Lorenz C, Hoffmann A, Gross G, Windhagen H, Dellinger P, Möhwald K, Dempwolf W, Menzel H. Coating of titanium implant materials with thin polymeric films for binding the signaling protein BMP2. *Macromol Biosci.* 2011; 11(2): 234-44.
- 111 Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, et al. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone.* 2005; 37(5): 699-710.

- 112 Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Zhou Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit.* 2020; 30: 26.
 - 113 Singh A, Gill G, Kaur H, Amhmed M, Jakhu H. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod.* 2018; 25; 19(1): 18.
 - 114 Makishi S, Yamazaki T, Ohshima H. Osteopontin on the Dental Implant Surface Promotes Direct Osteogenesis in Osseointegration. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3): 1039.
 - 115 Aragoneses J, López-Valverde N, López-Valverde A, Rodríguez C, Macedo De Sousa, B, Aragoneses, JM. Bone Response to Osteopontin-Functionalized Carboxyethylphosphonic Acid-Modified Implants. Experimental Study in a Minipig Model. *Frontiers in Materials.* 2022; 9: 914853.
-

ANEXO A – CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE E ASSOCIAÇÃO COM ESTRÔNCIO. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM RATOS"**, registrada com o nº 14/2020, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Joni Augusto Cirelli**– que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 23/09/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato Holtzman
Nº de animais	64
Peso/Idade	250-300g/03 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da FOAr (Câmpus-Araraquara)


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Ilumará nº 1.680 – Centro – CEP 14800-900 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua.foar@unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 27 de setembro 2025
(até 2 anos após a data de defesa)**

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 27 de setembro de 2023.

Pio Moerbeck da Costa Filho