



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Felipe Eduardo Pinotti

**Análise da osseointegração de implantes com superfície hidrofílica em
áreas enxertadas: estudo pré-clínico em ratos**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Felipe Eduardo Pinotti

**Análise da osseointegração de implantes com superfície hidrofílica em
áreas enxertadas: estudo pré-clínico em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Araraquara

2018

Pinotti, Felipe Eduardo

Análise da osseointegração de implantes com superfície hidrofílica em áreas enxertadas: estudo pré-clínico em ratos/
Felipe Eduardo Pinotti. – Araraquara: [s.n.], 2018

81 f. ; 30 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Materiais biocompatíveis 2. Osseointegração
3. Implantes dentários I. Título

Felipe Eduardo Pinotti

**Análise da osseointegração de implantes com superfície
hidrofílica em áreas enxertadas: estudo pré-clínico em ratos**

COMISSÃO JULGADORA

DEFESA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira -
UNESP/FOAr

2º Examinador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza - UNESP/FOAr

3º Examinador: Prof. Dr. Rubens Spin Neto – Universidade Aarhus - Dinamarca

Araraquara, 19 de Março de 2018

Dados Curriculares

Felipe Eduardo Pinotti

NASCIMENTO: 22.06.1992 – Araraquara SP

FILIAÇÃO: Wilson Francisco Pinotti Junior

Maria Teresinha Gomes da Silva Pinotti

2011 – 2015: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2016 – Atual: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de Concentração:
Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2017 – Atual : Curso de especialização – Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico primeiramente a Deus, por ter permitido que tudo isso acontecesse, pelas oportunidades e pessoas que colocou na minha vida e pela família maravilhosa que eu tenho, que apesar dos anos difíceis de mestrado, consegui ficar forte e conquistar todos meus objetivos. Aos meus pais Wilson e Teresinha, pelo enorme esforço e sacrifício para que eu tivesse toda a condição de fazer o melhor mestrado possível, cada conquista minha é também conquista de vocês. Ao meu irmão Vitor, que sempre está atento e pronto para me ajudar no que eu precisar e a minha namorada Mayara, que sempre que preciso desabafar, rir, estudar, e comentar tudo que preciso fazer, faz todo o esforço para me entender, e me dar o maior apoio que preciso. Aos meus orientadores, Adriana e Guilherme, muito obrigado pela paciência e ensinamentos, hoje vocês são minhas inspirações como dentistas e como pesquisadores, muito obrigado por tudo.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Guilherme, e a minha co-orientadora Adriana, por todo apoio e ajuda nesse projeto, com toda a certeza sem a ajuda e apoio de ambos, jamais tudo isso teria se concretizado. Aos funcionários da faculdade, em especial aos que trabalham no departamento de periodontia, que sempre estão prontos para ajudar e deixando tudo em perfeitas condições para que se realizem os trabalhos. Aos meus amigos, Cássio, José Rodolfo, Fernanda e Camila, que estão comigo desde o início da minha graduação, e hoje estamos juntos em mais uma caminhada que será no doutorado. Ao CNPQ, que me contemplou com uma bolsa de mestrado, e também me ofereceu todo auxílio necessário para realização do meu trabalho.

Pinotti FE. Análise da osseointegração de implantes com superfície hidrofílica em áreas enxertadas: estudo pré-clínico em ratos [Dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017

RESUMO

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito de uma superfície hidrofílica sobre a osseointegração de implantes em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado (DBB) ou com cerâmica bifásica a base de β -fosfato de cálcio/Hidroxiapatita (HA/TCP). Foram utilizados 56 ratos que foram aleatoriamente divididos em 4 grupos com 14 animais cada: DBB: Osso bovino desproteínizado (DBB) + Superfície usinada (U); HA/TCP: Cerâmica bifásica a base de β -fosfato de cálcio/Hidroxiapatita (HA/TCP) + Superfície U; DBB-H: DBB + Superfície hidrofílica (H); HA/TCP-H: HA/TCP + Superfície H. Foram confeccionados defeitos nas tíbias que foram preenchidos com os biomateriais, e os implantes foram inseridos 60 dias após esse procedimento. Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 15 e 45 dias após a instalação dos implantes. A osseointegração foi avaliada por análises biomecânicas, histométricas e microtomográfica. Adicionalmente a isso, foi avaliada a expressão da proteína morfogênica óssea 2 (BMP-2), da fosfatase alcalina (ALP) e da osteocalcina (OCN) por imunohistoquímica. O grupo HA/TCP-H apresentou maior contra torque para remoção de implantes e maior volume de tecidos mineralizados ao redor dos implantes que o grupo HA/TCP. Os grupos DBB-H e HA/TCP-H apresentaram maiores valores de contato osso-implante (15 e 45 dias), de osso entre as roscas dos implantes (45 dias), e de expressão de BMP2 (45 dias) do que os observados nos grupos DBB e HA/TCP. Adicionalmente, foi verificado uma maior expressão de ALP (15 dias) no grupo DBB-H do que no grupo DBB. Os implantes com superfície hidrofílica melhoram a osseointegração em áreas enxertadas em comparação com implantes com superfície usinada.

Palavras-chave: Biomateriais. Implantes dentários. Osseointegração.

Pinotti FE. Analysis of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in grafted areas. A Pre-clinical study [Dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of a hydrophilic surface on the osseointegration in grafted areas with deproteinized bovine bone (DBB) and with biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (HA/TCP). Fifty-six rats were randomly allocated to 4 groups with 14 animals each: DBB: Deproteinized bovine bone (DBB) + Machined surface (U); HA/TCP: biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (HA/TCP) + Machined surface; DBB-H: DBB + Hydrophilic surface (H); HA/TCP-H: HA/TCP + Hydrophilic surface. The bone defects were performed at the proximal epiphysis of the tibia. Then, the defects were filled with the biomaterials. After 60 days, the implants were placed in the grafted areas. The animals were submitted to euthanasia at periods of 15 and 45 days after the implants' placement. The osseointegration was assessed by biomechanical, microtomographic and histometric analyses. In addition, the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) was evaluated by immunohistochemistry. The HA/TCP-H group presented higher removal torque values and more volume of mineralized tissues in the vicinity of the implants compared with the HA/TCP group. The DBB-H and HA/TCP-H groups presented higher values of bone-implant contact (at 15 and 45 days), of bone between the threads (45 days), and expression of BMP-2 (45 days) than the DBB and HA/TCP groups. Furthermore, the DBB-H group presented a higher expression of ALP than the DBB group (15 days). In conclusion, implants with a hydrophilic surface improve osseointegration in grafted areas compared to implants with machined surfaces.

Key-words: Bone substitutes. Dental implants. Osseointegration.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	32
3 PUBLICAÇÃO.....	33
3.1 Publicação 1.....	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
5 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A	70
ANEXO A	80

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes osseointegrados para tratamento do edentulismo tem se tornado uma terapia cada vez mais difundida, sendo atualmente indicada para uma grande gama de situações clínicas com altas de sucesso no tratamento reabilitador^{1, 2}. Entretanto, situações inerentes ao sítio do hospedeiro tal como a falta disponibilidade óssea limita a instalação dos implantes osseointegrados em posição adequada em todos os casos^{3, 4}, e a utilização de biomateriais substitutos ósseos tem sido proposta para promover o aumento do volume ósseo, o que permite a instalação dos implantes dentários em posição adequada^{4, 5}. Apesar do osso autógeno ser considerado o biomaterial padrão ouro para ganho de tecido ósseo⁶, algumas limitações como a quantidade de enxerto ósseo possível de ser captado, a morbidade do leito doador e as suas altas taxas de reabsorção dificultam a utilização de enxertos autógenos em algumas situações clínicas^{7, 8}.

Como alternativa a utilização dos enxertos autógenos, enxertos com propriedades estritamente osteocondutoras tem sido utilizados, e dentro desse grupo, os enxertos de osso bovino desproteínizado (DBB) e da associação do β -fosfato tricálcio/Hidroxiapatita (HA/TCP) merecem destaque devido a sua alta previsibilidade reparo do tecido ósseo e longevidade no tratamento reabilitador^{5, 6, 9, 10}. Entretanto, tem sido relatado que implantes instalados em áreas enxertadas com biomateriais osteocondutores apresentam menores taxas de sobrevivência do que os implantes instalados em áreas de osso nativo¹¹ e em áreas enxertadas com osso autógeno¹². Um estudo pré-clínico demonstrou que que implantes instalados em defeitos ósseos executados em mandíbulas de cães e enxertados com DBB e HA/TCP apresentaram osseointegração semelhante as áreas enxertadas com osso autógeno, porém inferior aos defeitos cicatrizados espontaneamente¹³.

Alguns autores pesquisaram em estudos clínicos e pré-clínicos as consequências da instalação de implantes em áreas enxertadas:

Jensen et al.⁷ avaliaram a diferença de contato osso implante entre enxertos realizados para levantamento de seio com osso bovino desproteínizado misturado com osso autógeno provenientes de diferentes ossos do corpo e em diversas concentrações. No trabalho foram utilizados 40 mini-pigs que foram submetidos a cirurgia de levantamento de seio bilateralmente e foram divididos em 2 grupos com 20 animais em cada: Os levantamentos de seio foram realizados utilizando osso proveniente da crista ilíaca dos animais ou da mandíbula e misturadas com Osso bovino desproteínizado (DBB) em diferentes proporções, sendo dividido em 5 grupos com diferentes misturas de osso autógeno e osso bovino desproteínizado: (A) 100% de osso autógeno (crista ilíaca), (B) 75% de osso autógeno (crista ilíaca) e 25% de osso bovino desproteínizado, (C) 50% de osso autógeno (crista ilíaca) e 50% de osso bovino desproteínizado, (D) 75% de osso autógeno (mandíbula) e 25% de osso bovino desproteínizado, ou (E) 100% osso bovino desproteínizado. Um implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido foi inserido no mesmo momento cirúrgico do procedimento de enxertia. Os animais foram sacrificados após 12 semanas da colocação dos implantes, e foi mensurado o contato-osso-implante de cada implante colocado. A mediana de contato osso implante dos resultados obtidos em cada concentração foram: (A) 42,9% (IC 95%: 32,1-54,5%), (B) 37,8% (IC 95%: 27,1-49,9%), (C) 43,9% (IC 95%: 32,6-55,9%), (D) 30,2% (IC 95%: 21,6-40,3%) e (E) 13,9% (95% CI: 11,4-16,9%). O contato osso-implante foi significativamente maior para A, B, C, D em comparação com E ($p < 0,0001$). Não houveram diferenças estatisticamente significativas se comparados os enxertos autógenos provenientes na crista ilíaca ou provenientes da mandíbula. Os autores concluíram que a utilização de osso bovino

desproteínizado juntamente com osso autógeno promove uma melhor osseointegração em relação apenas a utilização de osso bovino desproteínizado puro.

Antunes et al.¹³ avaliaram a colocação de implantes em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado (DBB); beta-fosfato de tricálcio/hidroxiapatita (HA/TCP); osso autógeno (Ab) e coágulo (Cg). Seis cães foram submetidos a extrações de seus pré-molares inferiores, bilateralmente, sendo que 12 semanas depois foram confeccionados quatro defeitos ósseos (6mm de largura/4mm de comprimento) em um lado e preenchido aleatoriamente com DBB, HA/TCP, Ab e Cg. Após 8 semanas, um implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido, foi adicionado em cada local com as áreas enxertadas. Na mesma sessão, foram perfurados quatro defeitos semelhantes a estes do outro lado, e foram inseridos os implantes imediatamente a colocação dos enxertos. Todos os animais foram eutanaziados 8 semanas depois do segundo procedimento cirúrgico. Foram analisados estabilidade do implante (RFA), contato osso implante (BIC), área de formação óssea ao redor do implante (BA), distância do ombro do implante até a crista óssea. Os resultados mostraram que tanto BA quanto BIC foram superiores nos implantes onde foram realizados o enxerto e o implante foi instalado de forma tardia. O grupo Cg apresentou maior BIC e BA em comparação aos outros biomateriais ($p=0.004$ e 0.0012 , respectivamente), os grupos DBB, HA/TCP e Ab não tiveram diferenças estatisticamente significativa, porém o grupo onde o implante foi colocando imediatamente ao enxerto apresentou maior preservação da crista óssea. A estabilidade dos implantes foi maior nos grupos aonde os implantes foram instalados de forma tardia. Os autores concluíram que implantes colocados em defeitos que já foram previamente enxertados têm uma melhor estabilidade e conseqüentemente um maior BIC e BA, e que a instalação de implantes

imediatos associado ao uso de biomateriais deve ser preferível quando o objetivo é a maior preservação da crista alveolar.

Liu et al.¹⁴ avaliaram os efeitos do osso bovino desproteínizado na osseointegração de implantes. Para esse estudo foram utilizados 4 cachorros adultos. Os animais foram submetidos a cirurgia para extração dos 3° e 4° pré-molares da mandíbula bilateralmente. Dois sítios pós-extração foram randomicamente selecionados para serem preenchidos com osso bovino desproteínizado, enquanto os outros dois sítios cirúrgicos foram preenchidos com coágulo. Três meses depois de realizados os enxertos foram instalados implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido em cada sítio cirúrgico. Dois animais foram sacrificados três meses depois da colocação dos implantes, e os outros dois animais foram sacrificados seis meses depois da colocação dos implantes. A osseointegração foi avaliada por meio de análises histométricas de contato osso-implante (BIC) e de área de osso entre as roscas dos implantes (BA) e por microscopia de fluorescência, para a realização da imunofluorescência foi aplicada uma injeções com tetraciclina e vermelho de alizarina, por via subcutânea no momento da eutanásia dos animais para avaliar a taxa de formação óssea em cada período experimental. Após 3 meses, foi demonstrado que o BIC e o BA foram significativamente maiores no grupo experimental ($76\pm 9\%$ e $69,5\pm 9,6\%$, respectivamente) do que os do grupo controle ($56,1\pm 8,2\%$ e $52,8\pm 7,3\%$, respectivamente, $p=0,003$ e $0,001$). No entanto, os dois grupos não diferiram significativamente aos 6 meses. A microscopia de fluorescência mostrou que as taxas médias de mineralização do tecido ósseo em torno do implante no grupo experimental nos meses 3 e 6 foram de $6.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ e $8.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$, respectivamente, que foram significativamente superiores aos do grupo controle que apresentaram nos períodos de 3 e 6 meses $5.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ e $6.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$, respectivamente ($p=0.000$ e 0.03). Os autores

concluíram que o osso bovino desproteínizado pode promover a osseointegração após a colocação tardia de implantes em sítios que foram submetidos a extração dentária.

Pang et al.¹⁵ avaliaram clínica e radiograficamente a colocação de implante em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado após a extração dentária. Participaram nesse estudo 30 pacientes que possuíam um dente posterior na região da mandíbula que por meio de avaliações clínicas e radiográficas foi considerado condenado. Os pacientes foram divididos em dois grupos, no grupo controle os dentes foram extraídos e não foi utilizado nenhum enxerto, quanto que no grupo teste, após a extração do dente, o alvéolo foi preenchido com osso bovino desproteínizado. Logo após, o sítio enxertado foi recoberto com uma membrana reabsorvível. Seis meses após a extração dos dentes, foi instalado um implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido em todos os sítios e os pacientes foram reavaliados com 3 e 6 meses após a colocação dos implantes com relação a estabilidade (ISQ) e a perda óssea ao redor do implante. No grupo teste, a redução de altura média do osso da crista alveolar foi de 1.05 ± 0.24 mm aos 3 meses e 1.54 ± 0.25 mm aos 6 meses, a redução da largura do alvéolo foi de 1.11 ± 0.13 mm aos 3 meses e 1.84 ± 0.35 mm aos 6 meses, e a redução do volume de osso foi 193.79 ± 21.47 mm³ aos 3 meses e 262.06 ± 33.08 mm³ aos 6 meses. No grupo controle, a altura do osso da crista alveolar teve redução de 2.12 ± 0.15 mm aos 3 meses e de 3.26 ± 0.29 mm em 6 meses, a redução da largura foi 2.72 ± 0.19 mm aos 3 meses e 3.56 ± 0.28 mm aos 6 meses e a redução do volume de osso foi 252.19 ± 37.21 mm³ a 3 meses e 342.32 ± 36.41 mm³ aos 6 meses. A estabilidade dos implantes no período de 3 meses foi de 70.25 ± 2.77 no grupo experimental e 72.33 ± 3.52 no grupo controle, não havendo portanto diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os autores concluíram que o enxerto de osso bovino desproteínizado e a utilização da membrana de colágeno reabsorvível foi benéfica para preservar o

alvéolo, porém não teve influência estatisticamente significativa sobre a estabilidade e na quantidade de tecido ósseo reparado ao redor dos implantes.

Phillip et al.¹⁶ avaliaram a influência na osseointegração de implantes com uma superfície hidrofílica (implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido mantido em solução isotônica) em áreas enxertadas com HA/TCP em comparação com uma superfície convencional (implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido mantido em solução isotônica). Para o estudo foram utilizadas 32 ovelhas que foram divididas da seguinte forma: Em 16 ovelhas foi realizada o procedimento cirúrgico de levantamento de seio, utilizando HA/TCP de ambos os seios maxilares, e após o levantamento de seio foi realizada a colocação de um implante de superfície hidrofílica de um lado, e do outro um implante de superfície convencional. Nas outras 16 ovelhas não foi realizado o levantamento de seio, porém, foram instalados um implante de cada tipo em cada uma das regiões. Dentro de cada grupo as ovelhas foram sacrificadas nos períodos de 12 e 16 semanas. Foi posteriormente realizado uma análise histométrica para avaliação do contato osso implante (BIC). Após 12 semanas, o BIC para implantes com superfícies controle e hidrofílico, instalados em áreas enxertadas ou de osso nativo apresentaram resultados comparáveis com valores médios de 14,8% para implantes com superfície convencional instalados em osso nativo, 16,5% para implantes com superfície convencional instalados em área enxertada, 21,5% para implantes com superfície hidrofílica instalados em áreas de osso nativo e 20,1% para implantes com superfície hidrofílica instalados em áreas enxertadas ($p > 0,05$). Para seios não enxertados após 26 semanas, não foi registrado aumento do BIC (12,1% de superfície convencional, 15,8% de superfície hidrofílica; $p > 0,05$). Nos seios enxertados após 26 semanas, os valores médios de BIC aumentaram para 28,7% em superfícies convencionais e 34,1% para implantes com superfície

hidrofílica ($p=0,014$; $p = 0,015$). Os autores concluíram que após 12 semanas de cicatrização, nem o tipo de enxerto nem a superfície do implante parecem influenciar no BIC. O enxerto sintético promoveu uma melhora nos valores de BIC após 26 semanas.

Rickert et al.¹⁷ avaliaram a osseointegração de implantes colocados em regiões que foram submetidos a elevação do soalho do seio maxilar com enxertos de diferentes proporções de osso bovino desproteínizado (DBB) misturado com células mesenquimais da medula óssea ou osso autógeno. De uma maneira randômica, 12 pacientes foram submetidos a cirurgia de levantamento de seio bilateralmente, sendo que em um dos seios o enxerto foi realizado com osso bovino desproteínizado misturado com células mesenquimais provenientes da medula óssea da crista íliaca do paciente (grupo teste), e no outro seio o enxerto foi realizado com osso bovino desproteínizado misturado com osso autógeno proveniente da área retromolar do paciente (grupo controle). Quatro meses após a realização do levantamento de seio foram colocados 66 implantes. As análises foram realizadas no baseline e também 12 meses após a colocação dos implantes. Os autores avaliaram: Índice de sobrevivência de implantes, índice de placa, sangramento gengival, profundidade de sondagem e níveis ósseos radiográficos peri-implantares. Durante o período de osseointegração, três implantes não apresentaram osseointegração no lado teste e nenhum implante falhou no lado controle, resultando em taxas de sobrevivência de 91% (grupo teste) e 100% (grupo controle), respectivamente. Os resultados dos parâmetros analisados não tiveram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os autores concluíram que as duas técnicas para levantamento de seio maxilar promovem uma adequada osseointegração dos implantes, não tendo diferenças estatísticas entre o grupo em que foi realizado enxerto com osso bovino desproteínizado misturado com células

mesenquimais provenientes da crista íliaca do paciente em comparação ao grupo em que foi realizado a associação do DBB com o enxerto com osso autógeno.

Jensen et al.¹⁸ avaliaram a osseointegração de implantes colocados em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado (DBB) com partículas grandes e com partículas pequenas. Foram utilizados 10 minipigs, que foram submetidos a cirurgia de levantamento de seio bilateral. Os seios foram randomicamente selecionados para serem preenchidos com osso bovino desproteinizado com partículas grandes ou pequenas. Posteriormente, foi instalado um implante com superfície modificada por jateamento de óxidos e ataque ácido. Cinco animais foram sacrificados com 6 semanas, e outros 5 animais foram sacrificados com 12 semanas. Após o sacrifício foram realizados teste de estabilidade do implante (ISQ), análise histológica descritiva para avaliar a degradação das partículas do enxerto e formação óssea, além de análise histomorfométricas para avaliar o contato osso implante (BIC). O tamanho de partícula de osso bovino desproteinizado não teve impacto qualitativo ou quantitativo na quantidade de osso recém-formado, na degradação do biomaterial, BIC ou IS para qualquer um dos períodos de cicatrização ($p>0,05$). Os autores concluíram que os tamanhos das partículas de osso bovino desproteinizado foram igualmente eficientes para induzir formação óssea adequada para instalação de implantes em um modelo de levantamento de seio bilateral com simultânea colocação de implante.

Mellati et al.¹⁹ avaliaram a osseointegração de implantes com defeitos de deiscência vestibular em relação aos protocolos de implantes submersos em comparação aos implantes não submersos. Para o estudo foi utilizado seis cães que foram submetidos a uma cirurgia para extração dos dois incisivos laterais bilateralmente. Após a extração foi inserido um implante com superfície modificada por jateamento e ataque ácido, e em seguida foi realizado o preenchimento do “gap” com osso bovino

desproteínizado de ambos os lados. Um dos implantes foi mantido totalmente submerso enquanto que o outro implante foi planejado para que o seu parafuso de cobertura ficasse exposto ao meio bucal. Todos animais foram sacrificados três meses após a instalação dos implantes e foi posteriormente realizadas análises de descrição histológicas e histomorfométricas. Todos os implantes apresentaram estabilidade clínica ao término do período experimental. Na maioria dos casos, o osso coronal antigo teve uma reabsorção de aproximadamente 2-3 mm da crista bucal e foi substituído por uma parede de osso regenerada que consistiu em partículas de osso bovino desproteínizado e formação de osso novo. A reabsorção horizontal e vertical do osso bucal resultou em exposição ≥ 1 mm de a superfície do implante em um terço dos implantes. Nas medidas histomorfométricas (BIC), não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, submerso 0.66 ± 0.71 e grupo não submerso 1.40 ± 0.60 . Os autores concluíram que não houveram diferenças estatisticamente significativas na osseointegração entre esses dois protocolos de tratamento.

Dos Anjos et al.²⁰ avaliaram a estabilidade de implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido, colocados em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado com diferentes tamanhos de partículas. Dez pacientes edêntulos, que necessitavam de levantamento de seio bilateral foram utilizados no estudo, em um dos seios do paciente foi utilizado o osso bovino desproteínizado com partículas pequenas (0,25-1mm) e no lado contralateral foi utilizado um osso bovino desproteínizado com partículas grandes (1-2mm). Oito meses depois da cirurgia de levantamento dos seios foram instalados os implantes. Com o auxílio de um torquímetro e de um aparelho de ressonância foi mensurada a estabilidade do implante no momento de sua instalação (T0), e após seis meses do procedimento cirúrgico a estabilidade dos mesmos foi mensurada novamente (T1). Não houve complicações pós-cirúrgicas em

nenhum dos pacientes, sendo que os implantes apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas em relação a estabilidade do implante entre os grupos nos períodos T0 e T1, tanto no grupo de partículas pequenas (62.9 ± 6.8 e 63.5 ± 5.4 , respectivamente) como também no grupo de partículas grandes no T0 (59.7 ± 7.6) e T1 (62.1 ± 7.4). Os autores concluíram que tanto as partículas pequenas como também partículas grandes de osso bovino desproteínizado apresentaram propriedades adequadas para enxertia do seio maxilar permitindo a obtenção da osseointegração dos implantes de forma previsível.

Nedir et al.²¹ avaliaram a osseointegração de implantes curtos colocados em regiões que foram submetidas a levantamento de seio com osso bovino desproteínizado. Doze pacientes que foram submetidos a cirurgia de levantamento de seio, onde foram colocados trinta e sete implantes ao total. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: No grupo teste (17 implantes), os levantamentos de seio foram realizados sem a utilização de enxertos, enquanto no grupo controle (20 implantes), o levantamento de seio foi realizado com enxertia de osso bovino desproteínizado. Os pacientes passaram por avaliações radiográficas as 8 semanas, 1 ano e 3 anos após a instalação dos implantes e foram avaliados o nível periapical do osso, o nível da crista óssea e a ancoragem óssea ao redor do implante. Três implantes foram perdidos durante os 3 anos de acompanhamento, dois deles do grupo controle (enxerto) não apresentaram osseointegração e foram removidos, e um dos implantes do grupo teste foi removido após 2 anos e 7 meses pois apresentava peri-implantite. Dos implantes remanescentes, todos apresentaram uma formação óssea ao redor do implante (teste: 4.1 ± 1.0 mm; controle: 5.1 ± 1.2 mm; $p=0,01$), e nenhum dos outros parâmetros avaliados tiveram diferenças estatisticamente significativas. Os autores concluíram que o levantamento de seio com enxerto é desnecessário para obter um aumento ósseo menor que 4,1 mm; no

entanto, mais tecido mineralizado é obtido com enxerto do que o levantamento de seio sem a utilização de enxerto.

Tran et al.²² avaliaram a taxa de sobrevivência de implantes colocados em áreas de osso enxertadas com diferentes tipos de enxerto e em áreas não enxertadas. Foi executado um estudo retrospectivo com pacientes que receberam implantes na Universidade do Texas, de 1985 a 2012. Um total de 1.222 pacientes com 2.729 implantes no total foram incluídos no estudo. A taxa de sobrevivência nos períodos de 5 e 10 anos dos implantes foram de 92% e 87% respectivamente para implantes colocados em osso nativo, e 90% e 79% respectivamente para implantes colocados em áreas enxertadas. Os resultados que englobaram todos os dados colhidos do paciente mostraram que os que respeitaram o protocolo de manutenção após a colocação dos implantes apresentaram uma redução de 80% na perda desses implantes ($p < 0,001$), e que os paciente fumantes possuem 2.6x maior chance de perderem seus implantes. Os autores concluíram que não houve diferenças significativas em relação a taxa de sobrevivência dos implantes instalados em áreas enxertadas ou em osso nativo. Porém, situações como o fumo e a falta de manutenção demonstraram estar associadas a falha de implantes.

De Santis et al.²³ avaliaram a osseointegração de implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido em área enxertada com osso bovino desproteinizado em comparação com áreas enxertadas com o osso autógeno. Doze coelhos albinos da nova Zelândia foram utilizados para realizar o experimento. Em cada um dos coelhos foi realizada uma cirurgia para elevação de seio maxilar, sendo que 6 coelhos receberam enxerto de osso bovino desproteinizado no momento da cirurgia, e os outros 6 coelhos receberam osso autógeno proveniente da tíbia do animal. Imediatamente a realização dos enxertos foi realizada a inserção de um implante em

cada seio do animal. Dentro de cada grupo havia 2 períodos experimentais, 7 e 40 dias (3 coelhos em cada grupo experimental). Foram realizadas análises histométricas para mensurar o contato osso implante e a quantidade de osso neoformado em cada grupo. Os implantes não tiveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao contato osso implante após 7 ($7,1 \pm 1,7$ % vs. $9,9 \pm 4,5$ %) e 40 dias ($37,8 \pm 15$ % vs. $36,0 \pm 11,4$ %) nos sítios com osso bovino desproteínizado e osso autógeno, respectivamente. Quantidades semelhantes de osso novo foram encontrados nos seios elevados após 7 dias no grupo do enxerto de osso bovino desproteínizado ($7,8 \pm 6,6$ %) e enxerto de osso autógeno ($7,2 \pm 6,0$ %), enquanto que, após 40 dias, encontrou-se maior porcentagem de osso novo no grupo de enxerto de osso autógeno ($56,7 \pm 8,8$ %) em comparação com os sítios enxertados com osso bovino desproteínizado ($40,3 \pm 7,5$ %). Os autores concluíram que tanto o osso bovino desproteínizado quanto o osso autógeno permitiram a osseointegração de implantes instalados imediatamente em sítios enxertados em seios maxilares de coelhos, entretanto, a qualidade do tecido reparado foi melhor no grupo de enxerto de osso autógeno.

Uma abordagem utilizada para acelerar o processo de osseointegração é a utilização de implantes com superfície modificada^{24,25,26}. Essas modificações físico-químicas de superfície visam aumentar a estabilidade do coágulo que serve de guia para o início do processo de osseointegração²⁷. Dentre as características de superfície que aumentam a osseointegração dos implantes destacam-se as propriedades de topografia, composição química e molhabilidade^{26,27}. A superfície modificada por jateamento e ataque ácido e mantida em solução de cloreto de sódio tem demonstrado acelerar o processo de osseointegração^{24,27,28,29}, sendo que esses eventos têm sido relacionados a manutenção das camadas de óxidos promovido pela presença da solução de cloreto de sódio em contato com a superfície até o momento da instalação dos implantes,

impedindo que a superfície seja exposta ao oxigênio atmosférico mantendo-se assim a camada de óxidos e aumentando a molhabilidade dessa superfície^{24, 26, 28}.

Uma série de pesquisas foram realizadas utilizando essa modificação de superfície, visando uma aceleração da osseointegração do implante:

Buser et al.²⁴ avaliaram a aposição óssea em uma superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido em comparação a uma superfície que foi modificada pelo mesmo processo de jateamento e ataque ácido, porém, estes implantes foram armazenados em uma solução isotônica NaCl (Superfície hidrofílica). Os implantes foram colocados em 6 mini pigs na região anterior de maxila em um modelo de boca dividida. Os dentes anteriores da maxila foram removidos cuidadosamente e depois de 6 meses de cicatrização foram instalados de 3 a 4 implantes na maxila de cada animal. Os implantes com a superfície hidrofílica apresentaram maior porcentagem de contato osso-implante se comparado ao grupo controle (superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido) nos períodos de 2 (49,30 vs 29,42%; $p=0,017$) e 4 semanas (81,91 vs. 66,57%; $p=0,011$). No período de 8 semanas os resultados foram similares entre os grupos de implantes. Os autores concluíram que os implantes com superfície hidrofílica promovem uma maior aposição óssea nos primeiros estágios da osseointegração.

Bornstein et al.³⁰ avaliaram a taxa de sucesso de uma superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido funcionalmente carregada depois de 6 semanas de cicatrização. Foram inseridos 104 implantes em sítios posteriores de 51 pacientes parcialmente desdentados, sendo que 89 implantes foram instalados na mandíbula e 15 foram instalados na maxila. Após um período de 6 semanas todos os implantes foram funcionalmente carregados com coroas cimentadas ou parafusadas. Os pacientes foram reavaliados aos 3, 12, 24, 36, 48 e 60 meses para exames clínicos

(índice de placa, índice de sangramento, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e mobilidade) e radiográficos (distância entre a plataforma do implante e o primeiro contato visível entre o osso e o implante e nível da crista óssea). Os implantes apresentaram achados clínicos e radiográficos favoráveis nos retornos de até 5 anos de acompanhamento, a medição dos níveis de crista óssea indicaram estabilidade clínica, o que resultou em uma taxa de sucesso de 99% em 5 anos. Foi concluído que os implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido podem ser utilizados em um protocolo de carga precoce, após 6 semanas de cicatrização, por apresentar alta previsibilidade de sucesso após 5 anos de acompanhamento.

Schwarz et al.³¹ avaliaram a regeneração óssea de implantes (3,3mm por 8mm) do tipo SLAactive (Superfície hidrofílica) e SLApadrão (superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido/superfície hidrofóbica) colocados em regiões de deiscência óssea por vestibular em cães. Quatro cães foram submetidos a cirurgia aonde foram realizados em cada animal 4 defeitos ósseos de 3 mm de comprimento por 3mm de largura, sendo que 2 defeitos foram executados na mandíbula e 2 na maxila. Foram realizadas análises de comprimento do defeito, altura óssea ao redor do implante, porcentagem de preenchimento linear, contato osso-implante e área de preenchimento de osso novo. Como resultado os autores observaram que nos implantes com superfície padrão a cicatrização foram predominantemente caracterizadas pela formação de tecido conjuntivo denso tanto no período de 2 semanas como também no período de 12 semanas. Já nos implantes com superfície hidrofílica os autores observaram que no período de 12 semanas já havia um total preenchimento do defeito com tecido ósseo. Os resultados das análises com superfície hidrofílica: Altura óssea ao redor do implante ($3.2 \pm 0.3\text{mm}$); porcentagem de preenchimento linear (98%); Contato osso implante (82%) e área de osso novo ($2.3 \pm 0.4\text{mm}$) enquanto os implantes de superfície

hidrofóbica apresentaram: altura óssea ao redor do implante ($0.4 \pm 0.1\text{mm}$); porcentagem de preenchimento linear (10%); Contato osso implante (75%) e área de osso novo ($0.08 \pm 0.03\text{mm}$). Os autores concluíram que implantes com superfície hidrofílica podem promover uma melhor a regeneração óssea em áreas de deiscência óssea.

Schwarz et al.³² avaliaram a regeneração óssea de implantes dos tipos SLAactive (Superfície hidrofílica) e SLApadrão (superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido / superfície hidrofóbica) colocados em regiões de deiscência óssea, que foram mantidos submersos ou expostos a cavidade oral. Doze cães da raça beagle foram submetidos a cirurgia onde foram realizados em cada animal 16 defeitos ósseos de 3 mm de comprimento por 3mm de largura, sendo 8 na mandíbula e 8 na maxila. Quatro meses após a realização do defeito, foram instalados implantes no mesmo local aonde foram realizados os defeitos, seguindo um modelo de boca dividida, sendo que cada animal recebeu 8 implantes do com superfície de implante modificada por jateamento e ataque ácido (Padrão) e 8 implantes com superfície hidrofílica. Em cada animal foram instalados 4 implantes de cada tipo que foram mantidos de forma submersa ou de forma não submersa. Os cães foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 3 cães em cada, onde os animais sacrificados nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas, após a colocação dos implantes. As análises realizadas foram: altura do osso novo (NBH), porcentagem de preenchimento ósseo do defeito vestibular (PLF), contato osso implante (BIC-D), área de formação de osso novo (BF) e análise imuno-histoquímica para a proteína osteocalcina. Ocorreu diferença estatisticamente significava apenas no período de 8 semanas onde os implantes com superfície padrão não submersos e submersos apresentaram valores menores de NBH médio (1.1 ± 0.8 ; 1.9 ± 1.2 mm), PLF (27.7 ± 20.3 ; 46.0 ± 28.5 %), BIC-D (26.8 ± 10.4 ; 46.2 ± 16.2 %)

e BF (1.3 ± 0.9 ; 3.4 ± 2.8 mm²) do que os implantes com superfície hidrofílica aonde foram verificados valores de NBH ($2.6 \pm 0,8$; 4.3 ± 0.1 mm), PLF (64.2 ± 19.4 ; $107.2 \pm 4.7\%$), BIC-D (67.5 ± 18.8 ; 82.1 ± 148 %), BF (2.9 ± 1.0 ; 6.7 ± 1.1 mm²). Dentro do grupos dos implantes com superfície hidrofílica, os valores de BF foram mais elevados em implantes submersos. Os autores concluíram que implantes com superfície hidrofílica promoveram uma melhora na osseointegração que em relação aos implantes com superfície padrão. Adicionalmente, os implantes com superfície hidrofílica mantidos submersos apresentaram melhores resultados do que esse mesmo tipo de implante que não foram mantidos submersos.

Bornstein et al.³³ avaliaram a taxa de sucesso de implantes de titânio com uma superfície modificada por ataque ácido e por jateamento e mantidas em solução isotônica (Superfície hidrofílica), que foram funcionalmente carregados após 3 semanas de cicatrização e que foram acompanhados prospectivamente por 3 anos. Cinquenta e seis implantes foram inseridos na região posterior de mandíbula de 39 pacientes e após 21 dias de cicatrização foi instalada uma coroa provisória em oclusão. Os 56 implantes instalados foram considerados como sucesso por apresentarem padrões de saúde do tecido peri-implantar, nível de perda óssea, nível da crista óssea, tendo uma perda de crista óssea de aproximadamente 0.24mm e ausência de supuração e mobilidade em 100% dos casos. Os autores concluíram que a utilização de um protocolo de carregamento precoce dos implantes de titânio com a superfície hidrofílica podem atingir e manter uma osseointegração bem sucedida ao longo de um período de 3 anos.

Morton et al.³⁴ avaliaram implantes com superfície modificada por ataque ácido e jateamento e imersos em solução isotônica (superfície hidrofílica), quando colocados na região posterior de maxila ou mandíbula e que foram carregados proteticamente com 21 dias depois de sua instalação. Foram colocados 89 implantes

sendo que 12 foram instalados na maxila e 77 foram instalados na mandíbula de 56 pacientes. Os implantes foram carregados com restaurações provisórias após 21 dias de cicatrização. Oitenta e seis implantes apresentaram critérios clínicos (índice de placa, índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem) e radiográficos (distância entre a plataforma do implante até o primeiro contato osso implante, tendo como resultado: 0 meses 2.37 ± 0.06 ; 3 meses: 2.57 ± 0.04 ; 6 meses: 2.62 ± 0.04 ; 12 meses: 2.58 ± 0.04 e 24 meses 2.54 ± 0.05) favoráveis, sendo que dessa forma 97.7% destes implantes foram considerados com sucesso após 2 anos de tratamento. Os autores desse estudo concluíram que os implantes de titânio com superfície hidrofílica podem ser utilizados após o carregamento precoce após um período de 21 dias do procedimento cirúrgico com altas taxas de sucesso clínico após 2 anos de acompanhamento.

Lang et al.³⁵ avaliaram a osseointegração de implantes com uma superfície quimicamente modificada, moderadamente áspera e hidrofílica em comparação a uma superfície moderadamente áspera e hidrofóbica, durante os períodos iniciais de cicatrização em humanos. Os implantes utilizados neste estudo possuíam 4mm de comprimento por 2,8mm de diâmetro. Quarenta e nove implantes foram instalados na região retromolar da mandíbula de 28 pacientes e foram reavaliados nos períodos de 7,14, 28 e 42 dias de cicatrização, pela dificuldade da remoção dos implantes pela trefina nos primeiros períodos de cicatrização (7 e 14 dias), apenas 30 implantes foram analisados. Foi utilizada uma broca trefina para obter uma biópsia, e nesta, foi analisada a percentagem de contato osso-implante. A percentagem de contato osso-implante depois de 2 e 4 semanas foi maior na superfície quimicamente modificada, moderadamente áspera e hidrofílica, em comparação com a superfície moderadamente áspera e hidrofóbica (14.8 % vs. 12.2 % e 48.3 % vs 32.4 %, respectivamente), porém, depois de 42 dias não havia diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

(61.6 % vs 61.5 %). Os autores concluíram que a taxa de osseointegração em períodos de avaliação mais precoces foi superior em implantes com superfície quimicamente modificada, moderadamente áspera e hidrofílica se comparada a implantes que possuíam superfície moderadamente áspera e hidrofóbica.

Khandelwal et al.³⁶ avaliaram o potencial de osseointegração entre implantes com uma superfície modificada por jateamento e ataque ácido e imersos em solução isotônica (Superfície hidrofílica), em comparação a uma superfície modificada por jateamento e ataque ácido (Superfície padrão) em pacientes diabéticos descompensados. O estudo envolveu 24 pacientes com diabetes tipo 2, sendo que cada paciente recebeu 2 implantes na região posterior de mandíbula, sendo um deles uma superfície padrão e o outro com superfície hidrofílica. Nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas a estabilidade dos implantes colocados foi medida por análise de frequência de ressonância. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na estabilidade do implante com superfície padrão em comparação aos implantes com superfície hidrofílica. No total, quarenta e sete (98%) dos 48 implantes colocados foram considerados osseointegrados com sucesso. Foi concluído que a estabilidade secundária dos implantes com superfícies hidrofílica e padrão foram semelhantes em pacientes diabéticos tipo 2 com controle glicêmico inadequado.

Vasak et al.³⁷ avaliaram o efeito dos estágios iniciais de osseointegração em um implante com superfície hidrofílica em comparação a uma superfície hidrofóbica. Para o estudo foram utilizados 9 mini pigs, onde em um primeiro procedimento cirúrgico foram realizadas as extrações de todos os pré molares do animal, após 12 semanas das extrações foram instalados 12 implantes por animal, sendo que em cada quadrante foram alternando 3 tipos diferentes de implantes, INICELL (hidrofílica), SLAactive (hidrofílica), e uma superfície hidrofóbica modificada por jateamento e

ataque ácido. Os animais foram divididos em 3 períodos experimentais, onde foram sacrificados com 5, 10 e 15 dias após a instalação dos implantes, foi realizada a mensuração do contato osso implante (BIC). Os resultados mostraram que com valores de BIC superiores a 50% após 10 dias, todas as superfícies examinadas mostraram-se favoráveis a osseointegração a partir deste momento experimental. No dia 15, o novo osso de contato osso implante (BIC) de uma superfície hidrofílica (INICELL: $55,8 \pm 14,4\%$) foi ligeiramente maior que da superfície do implante hidrofóbico ($40,6 \pm 20,2\%$). Os autores concluíram que a superfície hidrofílica pode provocar uma ligeira tendência ao aumento da aposição óssea em mini pigs após 15 dias.

Wennerberg et al.²⁶ avaliaram como as nanoestruturas e a molhabilidade influenciam na osseointegração além de identificar se a molhabilidade, as nanoestruturas ou ambos em combinação desempenham o papel-chave na melhoria da osseointegração. Vinte e seis coelhos adultos foram divididos em quatro grupos, onde cada grupo recebeu um tipo diferente de implante na tíbia (implante hidrofóbico sem nanoestrutura, hidrofóbico com nanoestrutura, hidrofílico com baixa densidade de nanoestrutura e hidrofílico com alta densidade de nanoestrutura). Foram realizadas análises da superfície dos implantes (ângulo de contato, escaneamento de superfície com microscópio eletrônico, rugosidade e topografia) e análise biomecânica após 4 e 8 semanas. As amostras hidrofóbicas mostraram níveis mais elevados de contaminação de carbono, em comparação com as amostras hidrofílicas. Após 4 e 8 semanas de cicatrização, o grupo com superfície hidrofílica e com alta densidade de nanoestrutura apresentou diferenças estatisticamente significativas tendo maiores valores de força de remoção em comparação com os grupos com implante hidrofóbico sem nanoestrutura e hidrofóbico com nanoestrutura. Após 4 semanas, os implantes hidrofílicos com alta densidade de nanoestrutura mostraram os valores mais elevados (Ncm:85,3; 95% CI:

73,3 - 97,3) de força de torque de remoção do que os implantes hidrofóbicos sem nanoestrutura (Ncm:40,4; 95% CI: 28,5 - 52,4; $p < 0,0001$) e implantes hidrofóbicos com nanoestrutura Ncm 61,2; 95% CI: 49,3 - 73,2; $p = 0,0100$). Após 8 semanas, as amostras de implantes hidrofílicos com alta densidade de nanoestrutura (Ncm: 131,4; 95% CI: 114,7 - 125,3) demonstraram maior torque de remoção em comparação com implantes hidrofóbicos com nanoestrutura SLAnano (Ncm:96,4; 95% CI: 80,4-112,3; $P = 0,0036$) e implantes hidrofóbicos sem nanoestrutura (Ncm:93,7; 95% : CI: 67,8-99,6; $P < 0,0001$). Novamente implantes hidrofílicos com alta densidade de nanoestrutura vs. Implantes hidrofílicos com baixa densidade de nanoestrutura (Ncm:121,4; 95% CI: 105,6-137,4; $P = 0,7479$) demonstraram não ter diferença significativa, enquanto implantes hidrofílicos com baixa densidade de nanoestrutura apresentou maior torque de remoção em relação a implantes implantes hidrofóbicos sem nanoestrutura . Os autores desse estudo concluíram que a osseointegração foi melhor nos grupos que possuíam uma combinação de maior molhabilidade e presença de nanoestruturas.

Sartoretto et al.²⁸ avaliaram o impacto de dois tipos diferentes de superfícies de implantes sobre a osseointegração. Vinte coelhos foram divididos em 2 grupos (n=10) que foram submetidos a colocação dos implantes em ambas as tíbias. Os animais foram divididos entre os grupos de acordo com o tipo de superfície de implantes: G1 – superfície do implante tratado com jateamento e condicionamento ácido e G2- superfície do implante tratada com jateamento e condicionamento ácido, em seguida, mantido em uma solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Superfície hidrofílica). Foram realizadas análises de morfologia e rugosidade dos implantes, antes dos mesmos serem inseridos nas tíbias dos coelhos. Após os períodos de 14 e 28 dias os coelhos foram sacrificados e foram realizadas as análises histológicas de contato osso implante e histomorfométricas. Os implantes do grupo G2 apresentaram 3 vezes menos carbono

em sua superfície, além de uma maior hidrofiliabilidade em comparação aos implantes do grupo G1. A rugosidade superficial foi semelhante entre os dois grupos e os resultados de contato osso implante (BIC) e de área ocupada por osso entre as roscas (BAFO) foram semelhantes no período de 14 dias. Após 28 dias, as medições de BIC e BAFO apresentaram diferenças estatisticamente significativas, onde os implantes do grupo G2 apresentaram maior grau de osseointegração em comparação ao grupo G1 (BIC: Grupo 1, 38.6 ± 8.76 % e Grupo 2, 59.0 ± 7.14 %; BAFO: Grupo 1, 34.3 ± 6.26 % e Grupo 2, 53.68 ± 10.87 %). Os autores desse estudo concluíram que a menor quantidade de carbono e o aumento da molhabilidade foram responsáveis pelos melhores resultados dos implantes com superfície hidrofílica em comparação a superfície padrão.

Apesar da ampla documentação existente sobre a osseointegração de implantes com superfícies hidrofílicas em áreas de osso nativo, o padrão de osseointegração dessas superfícies em áreas de osso enxertado tem sido pouco explorada. Um estudo pré-clínico demonstrou que a osseointegração de implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido e mantida em solução de cloreto de sódio não foi superior aos implantes com superfície modificada por jateamento e ataque ácido após 12 e 26 semanas em modelo de levantamento de seio em ovelhas que foram enxertadas com HA/TCP¹⁶. Entretanto, a avaliação da osseointegração de superfícies hidrofílicas em diferentes tipos de biomateriais osteocondutores e em estágios mais precoces de cicatrização necessitam ser explorados.

2 PROPOSIÇÃO

Geral

O objetivo geral desse estudo foi de avaliar o efeito de uma superfície de implante hidrofílica sobre a osseointegração em áreas enxertadas com biomateriais de origem xenogênica e aloplástica.

Específico

Os objetivos específicos desse estudo foram de avaliar em áreas enxertadas com diferentes biomateriais, o efeito da superfície hidrofílica de implantes osseointegráveis sobre:

- 1) O torque de remoção dos implantes;
- 2) A osseointegração dos implantes;
- 3) A expressão de proteínas relacionadas a remodelação óssea.

3 PUBLICAÇÃO

Este estudo gerou um artigo que foi enviado para publicação na revista Clinical Oral Implants Research está em fase de resposta aos pareceristas.

3.1 Publicação

Original Paper: Analysis of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in grafted areas. A Pre-clinical study.

Felipe Eduardo Pinotti^a, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira^a, Maurício Andres Tinajero Aroni^a, Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio^a, Elcio Marcantonio Jr^{a*}

^aSão Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, Brazil.

Author for correspondence:

Elcio Marcantonio Junior

Humaitá St., 1680. Zip-Code 14801-130, Araraquara, SP. Brasil

Phone: (16) 33016376 / Fax: (16) 33016369

e-mail: elciojr@foar.unesp.br

*Este artigo segue as normas do periódico Clinical Oral Implants Research no qual foi submetido.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of a hydrophilic surface on the osseointegration in grafted areas with deproteinized bovine bone (DBB) and with biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (HA/TCP). Fifty-six rats were randomly allocated to 4 groups with 14 animals each: DBB: DBB + Machined surface; HA/TCP: HA/TCP + Machined surface; DBB-H: DBB + Hydrophilic surface; HA/TCP-H: HA/TCP + Hydrophilic surface. The bone defects were performed at the proximal epiphysis of the tibia. Then, the defects were filled with the biomaterials. After 60 days, the implants were placed in the grafted areas. The animals were submitted to euthanasia at periods of 15 and 45 days after the implants' placement. The osseointegration was assessed by biomechanical, microtomographic and histometric analyses. In addition, the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) was evaluated by immunohistochemistry. The HA/TCP-H group presented higher removal torque values and more mineralized tissue in the vicinity of the implants compared with the HA/TCP group. The DBB-H and HA/TCP-H groups presented higher values of bone-implant contact (at 15 and 45 days), of bone between the threads (45 days), and expression of BMP-2 (45 days) than the DBB and HA/TCP groups. Furthermore, the DBB-H group presented a higher expression of ALP than the DBB group (15 days). In conclusion, implants with a hydrophilic surface improve osseointegration in grafted areas compared to implants with machined surfaces.

Key-words: Bone substitutes, implants surfaces, osseointegration.

Introduction

The use of osseointegrated implants for the treatment of edentulism has become an increasingly widespread therapy and is currently indicated for a wide range of clinical situations with high success rates in oral rehabilitation treatment (Galindo-Moreno, et al. 2017, Papaspyridakos, et al. 2014). However, local conditions inherent to the host site, such as the lack of bone availability, may impair the installation of osseointegrated implants in an adequate position in some cases (Benic & Hammerle 2014, Wang & Lang 2012), and the use of bone substitutes have been proposed as an alternative to enhance the bone volume, which can enable implant placement (Hallman & Thor 2008, Wang & Lang 2012). The autogenous bone graft has been considered the gold standard bone substitute for bone grafting procedures, since it is a unique biomaterial that presents all the biological properties needed for bone tissue formation (e.g., osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction) (Schmitt, et al. 2013, Spin-Neto, et al. 2013). However, some limitations, such as the amount of bone graft available for harvesting, the morbidity of the donor site and high rates of graft resorption can impair the use of autogenous bone grafts (Jensen, et al. 2012, Nkenke & Neukam 2014).

As an alternative to the use of autogenous bone grafts, some bone substitutes with strictly osteoconductive properties have been used, and within this group, deproteinized bovine bone grafts (DBB) and biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (HA / TCP) deserve highlighting due to their high predictability in increasing bone availability and promoting longevity in oral rehabilitation treatment (Hallman & Thor 2008, Mardas, et al. 2010, Schmitt, et al. 2013, Wu, et al. 2016). However, it has been reported that implants installed in areas grafted with osteoconductive biomaterials have lower survival rates than implants installed in areas of native bone (Sesma, et al. 2012) or in areas grafted with autogenous bone (Zinser, et

al. 2013). A pre-clinical study showed that implants placed in bone defects performed on dogs' jaws and grafted with DBB and HA/TCP presented similar a osseointegration degree to the implants placed in areas grafted with autogenous bone, but the osseointegration of the grafted areas was lower compared with the implants placed in spontaneously healed defects (Antunes, et al. 2013).

One approach used to accelerate the process of osseointegration is the use of implants with modified surfaces (Buser, et al. 2004, Faeda, et al. 2012, Shibli, et al. 2007, van Velzen, et al. 2015, Wennerberg, et al. 2014). These physico-chemical surface modifications aim to increase adhesion and stability of the blood clot, which serves as a guide for the initiation of the osseointegration process (Bosshardt, et al. 2017, Faeda, et al. 2012, Shibli, et al. 2007). Among the most effective surface properties that increase the osseointegration of implants are properties of topography, chemical composition and wettability (Bosshardt, et al. 2017, Wennerberg, et al. 2014). Surfaces modified by sandblasting and acid etching and maintained in sodium chloride solution have been shown to accelerate the process of osseointegration (Bosshardt, et al. 2017, Buser, et al. 2004, Hinkle, et al. 2014, Sartoretto, et al. 2015), and these events have been related to the maintenance of the oxide layers promoted by the presence of the sodium chloride solution in contact with the surface until the moment of implant installation, preventing surface exposure to atmospheric oxygen, and thus preserving the oxide layer and increasing the wettability and hydrophilicity of this surface (Buser, et al. 2004, Sartoretto, et al. 2015, Wennerberg, et al. 2014).

Despite extensive documentation about enhancement of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in areas of native bone (Bornstein, et al. 2009, Buser, et al. 2004, Chambrone, et al. 2015, Hinkle, et al. 2014, Khandelwal, et al. 2013, Kokovic, et al. 2014, Lang, et al. 2011, Morton, et al. 2010), the pattern of

osseointegration of these surfaces in areas of grafted bone has been poorly explored. A preclinical study demonstrated that the osseointegration of implants with hydrophilic surfaces was not superior to implants with surfaces modified by sandblasting and acid etching after 12 and 26 weeks in the maxillary sinus of sheep grafted with HA/TCP (Philipp, et al. 2014). However, evaluation of the osseointegration of hydrophilic surfaces in different types of osteoconductive biomaterials and in earlier stages of healing needs to be explored. Therefore, the purpose of this pre-clinical study was to evaluate the effect of a hydrophilic surface on the osseointegration of implants in grafted areas using deproteinized bovine bone (DBB) and biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (HA/TCP).

Material and methods

This study was submitted and approved Animal Ethics Commission of the São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, Brazil (CEUA: 26/2016). Fifty-six 12-week-old rats (*Rattus norvegicus*, variation Hotzman) weighing between 250-300 g were used in this study. The animals were maintained in an environment with controlled temperature (21 ± 1 °C), humidity (65-70%), and light cycles (12 hours). Water and rat chow were offered to the rats *ad libitum*. The study was conducted according the ARRIVE protocol guidelines.

Groups

The animals were randomly allocated to 4 groups with 14 animals each that were divided according the type of biomaterial and implants used: **DBB**: The bone defects were filled with deproteinized bovine bone graft (Bio-Oss®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), and implants with a machined surface were installed (Neodent®, Curitiba, Brazil); **HA/TCP**: The bone defects were filled with biphasic ceramics of

hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate (Straumann® Bone Ceramic, Straumann AG, Basel, Switzerland), and implants with a machined surface were installed; **DBB-H**: The bone defects were filled with deproteinized bovine bone graft, and implants with hydrophilic surfaces were installed (ACQUA surface, Neodent®, Curitiba, Brazil); **HA/TCP-H**: The bone defects were filled with biphasic ceramics of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate, and implants with hydrophilic surfaces were installed.

Surgical procedure

The animals were anaesthetized by a combination of ketamine (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brazil) at a dosage of 0.08 ml/100 g body weight with xylazine (Rompum, Bayer SA, São Paulo, SP, Brazil) at a dosage of 0.04 ml/100 g body weight. Subsequently, the animals were submitted to a tricotomy of the internal region of the right and left hind paws, and antisepsis was used.

A 10-mm-incision was performed in planes on the tuberosity of the tibia. After a delicate dissection, the bone tissue was submitted to an osteotomy by means of a spherical drill mounted in a low-speed driller with the aid of an electric motor adjusted to 1200 rpm (BLM 600, Driller, São Paulo, Brazil) under abundant irrigation with sterile saline. The bone defect had a 4-mm length and width and a 1.5-mm depth. The defect was then filled with the different bone substitutes. The tissue was sutured by planes internally with resorbable suture (5.0 Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil) and closed with silk thread (4.0 Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil). The animals received a single dosage of penicillin with streptomycin at a dosage of 0.1 ml/kg (Multibiótico Small, Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, Brazil) and ketoprofen at a dosage of 0.1 ml/kg (Ketoflex; Mundo Animal, São Paulo, Brazil) intramuscularly.

After 60 days, a second surgical intervention was performed to install the implants at the grafted areas. An incision similar to the first procedure was performed on the tibias tuberosity. The grafted area was prepared for implant installation by applying a progressive sequence of drills (milling drill, 2.0 mm spiral drill - Neodent®, Curitiba, Brazil) to accommodate a 4-mm-high titanium implant with a 2.2-mm diameter (Machined and Acqua surfaces, Neodent®, Curitiba, Brazil). All surgical procedures were performed with the aid of an electric motor, adjusted to 1200 rpm, under abundant irrigation with sterile saline solution. The implants were installed with the aid of a digital key (1.2 mm hexagonal digital key - Neodent, Curitiba, PR, Brazil). The sutures and the postoperative care protocol used was similar to that used in the first surgery.

After 15 and 45 days post implant placement (Figure 1), the animals were submitted to euthanasia by an overdose of anaesthetic. The tibias were separated according to the analyses performed. The right tibia was used for microtomographic and histomorphometric analyses, while the left tibia was used for biomechanical analysis, histological descriptions and immunohistochemically analyses.

Biomechanical analysis

After euthanasia, the left tibias were stabilized in a small vise. A hexagonal wrench was attached to both implants and were torqued with a wrench (Tohnichi, model ATG24CN-S, Tokyo, Japan) by an anti-clockwise movement to unscrew the implant. The maximum torque needed to move the implant was noted as the removal torque value.

μCT

The right tibias were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and later stored in 70° ethanol. These samples were scanned by a μCT scan (Skyscan, Aatselaar, Belgium)

with the following parameters: Camera pixel: 12.45; X-ray tube potency: 65 kVP, X-ray intensity: 385 μ A, integration time: 300 ms, filter: Al-1 mm, voxel size: 18 μ m³. The images were reconstructed, spatially repositioned and analysed by specific software (NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Belgium). The region of interest (ROI) was defined as a 0.5-mm circular region around the entire diameter of the implant. This ROI was defined as the Total Volume (0.5 mm margin around implants - 4.5 mm \times 3.2 mm). As the implants placed did not receive a cover screw, there was bone formation inside the platform in some cases. To prevent this bone formation interfering with the analysis of the volume of mineralized tissue around the implant, a second ROI was established to remove the volume of the platform. With the results obtained in the two ROIs, it was possible to define the volume of bone formation using the formula: Total Volume - Volume Platform = Volume of Mineralized Tissues. The threshold used in the analysis was 25-90 in greyscale, and the volume values of the mineralized tissue around the implants were obtained as a percentage. A trained and blinded examiner for the experimental groups performed this analysis (FEP).

Histometry and descriptive histology

After μ CT scanning, the right tibiae were dehydrated in increasing series of ethanols (60-100%) and infiltrated and polymerized using light-curing resin (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraus GmbH & CO, Wehrheim, Germany). The blocks containing the implant and the bone tissue were cut at a central point using a cut and wear system for non-decalcified samples (Exakt Apparatebau, Hamburg, Germany). The final sections were approximately 45- μ m thick and were stained with Stevenel's blue associated with acid fuchsin. Then, sections were analysed using an optical microscope (DIASTAR - Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Germany) at a magnification of 100 \times . The histomorphometric evaluation was performed using software for image analysis

(ImageJ, San Rafael, CA, USA). The percentages of bone-implant contact (% BIC) and bone area between the implant threads (% BBT) were evaluated in the first six implant threads. An analysis was also performed on the amount of bone and biomaterial in the vicinity of the first 6 threads. These analyses were performed by a blinded and trained examiner (FEP).

The tibias that had the implants removed were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, washed in running water for 12 hours and placed in 7% EDTA solution for 8 weeks. Subsequently, the samples were washed and dehydrated in alcohol, diaphanized in xylol and imbedded in paraffin. The sections were oriented parallel to the long axis of the site where the implants were inserted. The 4- μ m-thick sections were mounted onto common (for haematoxylin-eosin staining) and silanized slides (for immunohistochemical analysis).

A histological description was performed to evaluate the aspect of the new bone and the maturation process. The evaluations were performed by a trained and blinded examiner for the experimental groups with the aid of a DIASTAR optical microscope (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Germany) with magnifications of 100 \times and 200 \times (GJO).

Immunohistochemistry analysis

The immunohistochemical analyses were performed to identify and localize the expression of proteins related to bone remodelling: osteocalcin (OCN), bone morphogenic protein-2 (BMP2), and alkaline phosphatase (ALP). Histological sections were mounted on silanized slides, followed by routine laboratory procedures for deparaffinization and rehydration. Subsequently, the sections were subjected to non-specific epitope blockade by the application of 3% hydrogen peroxide for 30 minutes and 3% bovine albumin protein for 120 minutes. Then, the sections were incubated for

16 hours in the following primary antibodies: OCN (1:400); BMP-2 (1:400) and ALP (1:800). As a negative control, histological sections were treated with 1% PBS. Subsequently, the sections were treated by avidin-biotin-peroxidase complex and stained by diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were counterstained with Carrazi's haematoxylin solution for visualization of the cell nuclei. The images were obtained using a camera coupled to a light microscope (Leica-Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany). The expression levels of the proteins were assessed through a protein labelling extension index (de Oliveira, et al. 2014) that was performed in the coronal half of the surgical implant bed: (0) without labelling (0% of cells / matrix); (1) weak labelling (<25% of cells / matrix); (2) moderate labelling (25-50% of cells / matrix); (3) strong labelling (<50% of cells / matrix). The analyses were performed by a blinded and trained examiner for this analysis (GJO).

Statistics

GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis of this study. The data generated by the histometric, microtomographic and biomechanical analyses were numerical; in this way, the data were submitted to the Shapiro-Wilk Normality test to evaluate if the data were distributed according to the central distribution theorem. The data from the biomechanical and immunohistochemical analyses that were not distributed according the normality were analysed using the non-parametric Mann-Whitney test. The data from the microtomographic and histometric analyses were distributed according to normality and were analysed using the non-paired t-test parametric test. All tests of this study were applied with a significance level set at 95%.

Results

All animals survived and supported the experimental tests. Thus, all the samples were used in the analysis proposed. Calculation of the statistical power was based on the BIC data of this study. According to data from 45 days, taking into account that the smallest difference between the means between the groups where there were statistically significant differences was 19.29% with a standard deviation of 6.59%, it was verified that a sample of 7 animals per group/period was sufficient to apply statistical tests with an α -type error of 0.05 and a β -power of 0.90.

Biomechanical analysis

An increase in implant removal torque was observed when comparing the 45-day periods versus the 15-day periods in all the groups. There was a significant increase in removal torque in the HA/TCP-H group (2.71 ± 0.48 Ncm at 15 days and 6.57 ± 2.69 Ncm at 45 days) compared to the HA/TCP group (1.71 ± 0.48 Ncm at 15 days and 3.85 ± 2.03 Ncm at 45 days) for both assessment periods (Table 1).

μ CT

The volume of mineralized tissue around the implants increased in the 45-day period compared to the 15-day period in all groups ($p < 0.05$), with the exception of the DBB-H group. The HA/TCP-H group ($33.83 \pm 5.65\%$ at 15 days and $44.30 \pm 3.07\%$ at 45 days) had a higher volume of mineralized tissues around the implant than the HA/TCP group ($27.46 \pm 3.49\%$ at 15 days and $37.97 \pm 3.43\%$ at 45 days) for both evaluation periods ($p < 0.05$) (Table 2).

Descriptive histology/Histometry

The histological appearance of the grafted tissue did not differ between the groups in the different evaluation periods. At 15 days, the formation of an osteoid matrix with rounded osteocytes and active osteoblasts with a large volume of cytoplasm was verified. Also verified was a great presence of blood vessels and the presence of biomaterials in contact with the neoformed bone tissue. At the 45-day period, it was shown that the bone tissue was at an advanced stage of maturation, with well-established or in-formation Havers channels, flattened osteocytes and presence of few reversion lines. The biomaterials were not totally resorbed in any group, and a good part of the bone substitutes was in close contact with the neoformed bone tissue (Figure 2).

Regarding the histometric analyses, a greater %BIC was observed in all groups where an implant with a hydrophilic surface was used in comparison with the groups where implants with machined surfaces were used in both periods of evaluation. At 15 days, the DBB-H and HA/TCP-H groups presented %BIC of $14.08 \pm 3.57\%$ and $15.75 \pm 6.31\%$, respectively, while the DBB and HA/TCP groups presented %BIC de $8.15 \pm 5.69\%$ and $7.89 \pm 5.47\%$, respectively. At the 45-day period, the DBB-H and HA/TCP-H groups presented %BIC of $39.60 \pm 14.28\%$ and $44.33 \pm 22.49\%$, while the DBB and HA/TCP groups presented %BIC of $20.32 \pm 7.69\%$ and $11.21 \pm 6.82\%$ (Table 3; Figure 3).

The %BBT was higher in the DBB-H and HA/TCP-H groups compared with the DBB and HA/TCP groups at the 45-day period. At this period, the DBB-H and HA/TCP-H presented a %BBT of $44.79 \pm 10.61\%$ and $47.05 \pm 20.52\%$, respectively. The DBB and HA/TCP groups presented %BBT of $25.64 \pm 11.70\%$ and $11.37 \pm 7.09\%$, respectively (Table 4; Figure 3). The amount of bone in the grafted areas near the implants was higher in the DBB-H groups ($33.41 \pm 10.50\%$ at 15 days and $38.87 \pm 15.34\%$ at 45 days) compared to the DBB group ($18.03 \pm 8.04\%$ at 15 days and $23.12 \pm$

11.61 5 to 45 days) (Table 5), while the amount of biomaterial was not statistically different between the groups (Table 6).

Immunohistochemistry analysis

A higher expression of BMP-2 was observed in the DBB-H and HA/TCP-H groups than in the DBB and HA/TCP groups at the 45-day period. In addition, a greater expression of ALP was observed in the DBB-H group compared to the DBB group at the 15-day period. There were no differences in the expression of OCN between the groups of implants with machined and hydrophilic surfaces (Figure 4).

Discussion

In general, it was verified in the present study that a hydrophilic implant surface promoted a better osseointegration pattern in areas grafted with DBB and HA/TCP compared to the machined surfaces. The results of the histometric analysis showed that the implants with a hydrophilic surface had a higher %BIC and %BBT in relation to the machined surface implants in the areas grafted with both biomaterials. This result corroborates previous studies that demonstrated that implants with a modified surface have a greater bone-to-implant contact than implants with machined surfaces in areas of native bone (Faeda, et al. 2012, Grassi, et al. 2006, Shibli, et al. 2007, Trisi, et al. 2003).

Regarding dental implants with hydrophilic surfaces, it has been reported in the literature that these types of implant surfaces promoted greater osseointegration in areas of native bone than implants than other types of surface modifications (Buser, et al. 2004, Lang, et al. 2011). A pre-clinical study showed that implants with hydrophilic surfaces had a higher percentage of bone-implant contact compared to implants with surfaces modified by sandblasting and acid etching at the periods of 2 (49.40% vs. 29.42%) and 4 (81.91% vs. 66.57%) weeks in minipigs (Buser, et al. 2004). It was

observed in another study that implants with a hydrophilic surface installed in the retromolar region of humans presented a higher degree of osseointegration than implants with surfaces treated with sandblasting and acid etching after 4 weeks of the surgical procedure (48.3% vs. 32.4%, respectively) (Lang, et al. 2011). It has been justified that the acceleration of the osseointegration promoted by this hydrophilic surface is due to immersion of the implants in a saline substance that protects it from atmospheric air, preventing contamination by carbon and hydrocarbons and thus avoiding the loss of energy of the surface and improving its wettability (Bosshardt, et al. 2017, Vasak, et al. 2014, Wennerberg, et al. 2014). The only preclinical study that evaluated the osseointegration of hydrophilic surface implants in grafted areas with osteoconductive biomaterials showed no superiority of hydrophilic surfaces compared to surfaces with sandblasting and acid etching in maxillary sinuses of sheep grafted with HA/TCP; however, the long evaluation periods (12 and 26 weeks) may explain the absence of differences between these surfaces (Philipp, et al. 2014).

The results of this study also demonstrated that the use of implants with hydrophilic surfaces increased the removal torque values and the volume of mineralized tissues around the implants installed in grafted areas, and this difference was statistically significant only in areas grafted with HA/TCP. The absence of differences of these parameters in the DBB grafted areas may be due to the greater osteoconduction potential promoted by this biomaterial in relation to HA/TCP, as was demonstrated in previous studies (Antunes, et al. 2013, Cordaro, et al. 2008). Thus, the influence of the hydrophilic surface seems to be greater in areas grafted with HA/TCP that present a lower osteoconductive potential in relation to the DBB. Furthermore, it has been shown in clinical studies that the DBB presented more graft remnants than the HA/TCP (Cordaro, et al. 2008, Schmitt, et al. 2013), and this characteristic may be influenced the

volume of mineralized tissues around the implants. Thus, the impact of the use of hydrophilic surfaces is likely to be more evident in areas grafted with biomaterials with a lower osteoconductive potential, as demonstrated in this study.

The increase in osseointegration observed in the hydrophilic surface implants in DBB and HA/TCP grafted areas was associated with an increased expression of BMP-2 and ALP proteins in the bone tissue close to the surface of the implants compared with machined surface implants. Since these proteins are related to an increased differentiation and osteoblastic function and to the formation of bone tissue (Cheng, et al. 2003, Fahmy-Garcia, et al. 2017, Mansell, et al. 2017), it can be inferred that the increased expression of these proteins may enable an enhancement of the osseointegration promoted by hydrophilic surfaces. Indeed, *in vitro* studies with osteoblastic lineage cells demonstrated that hydrophilic implant surfaces enhance the expression of important proteins for bone tissue formation, such as VEGF, ALP, OPG, and TGF β 1 (Rausch-fan, et al. 2008), improving adhesion, proliferation, differentiation and activation of osteoblastic activity (Thalji, et al. 2013, Zhao, et al. 2005).

The improvement in the osseointegration pattern promoted by the hydrophilic surfaces in the grafted areas may clinically represent the reduction in the waiting time for the application of prosthetic loading in the implants placed in these areas, which are characterized by reduced mechanical properties compared to native bone areas. Despite these promising results, it should be noted that this study presents limitations, such as the comparison of the hydrophilic surface with a machined surface, because currently the use of machined surfaces is not a common clinical practice, and therefore the comparison of osseointegration in areas grafted with other types of modified surfaces implants should be investigated. To prove the inference that the hydrophilic surfaces can reduce the clinical time for the application of the prosthetic load in grafted areas, it

will be necessary to compare the hydrophilic surface implants with other types of implant surfaces in models that induce occlusal loads in grafted areas. In addition, the effect of the hydrophilic surface on osseointegration in areas grafted with other types of bone substitutes remains uncertain.

Conclusion

It can be concluded that implants with hydrophilic surfaces have a better osseointegration pattern in DBB and HA / TCP grafted areas than implants with machined surfaces.

References

- Antunes, A. A., Oliveira Neto, P., de Santis, E., Caneva, M., Botticelli, D. & Salata, L. A. (2013) Comparisons between bio-oss((r)) and straumann((r)) bone ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res* **24**: 135-142.
- Benic, G. I. & Hammerle, C. H. (2014) Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000* **66**: 13-40.
- Bornstein, M. M., Hart, C. N., Halbritter, S. A., Morton, D. & Buser, D. (2009) Early loading of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sand-blasted and acid-etched surface: 6-month results of a prospective case series study in the posterior mandible focusing on peri-implant crestal bone changes and implant stability quotient (isq) values. *Clin Implant Dent Relat Res* **11**: 338-347.
- Bosshardt, D. D., Chappuis, V. & Buser, D. (2017) Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: Current knowledge and open questions. *Periodontol 2000* **73**: 22-40.

- Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S. G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified sla titanium surface. *J Dent Res* **83**: 529-533.
- Chambrone, L., Shibli, J. A., Mercurio, C. E., Cardoso, B. & Preshaw, P. M. (2015) Efficacy of standard (sla) and modified sandblasted and acid-etched (slactive) dental implants in promoting immediate and/or early occlusal loading protocols: A systematic review of prospective studies. *Clin Oral Implants Res* **26**: 359-370.
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y. & He, T. C. (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (bmps). *J Bone Joint Surg Am* **85-A**: 1544-1552.
- Cordaro, L., Bosshardt, D. D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G. & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with bio-oss or straumann bone ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **19**: 796-803.
- de Oliveira, G. J., de Paula, L. G., Spin-Neto, R., Stavropoulos, A., Spolidorio, L. C., Marcantonio, E., Jr. & Marcantonio, R. A. (2014) Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: A proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **29**: 949-957.
- Faeda, R. S., Spin-Neto, R., Marcantonio, E., Guastaldi, A. C. & Marcantonio, E., Jr. (2012) Laser ablation in titanium implants followed by biomimetic hydroxyapatite coating: Histomorphometric study in rabbits. *Microsc Res Tech* **75**: 940-948.
- Fahmy-Garcia, S., van Driel, M., Witte-Buoma, J., Walles, H., van Leeuwen, J. P., van Osch, G. & Farrell, E. (2017) Nell-1, hmgb1 and ccn2 enhance migration and

vasculogenesis, but not osteogenic differentiation compared to bmp2. *Tissue Eng Part A*.

Galindo-Moreno, P., Nilsson, P., King, P., Worsaae, N., Schramm, A., Padial-Molina, M. & Maiorana, C. (2017) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter implants: 5-year follow-up of a multicenter prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res*.

Grassi, S., Piattelli, A., de Figueiredo, L. C., Feres, M., de Melo, L., Iezzi, G., Alba, R. C., Jr. & Shibli, J. A. (2006) Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol* **77**: 1736-1743.

Hallman, M. & Thor, A. (2008) Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000* **47**: 172-192.

Hinkle, R. M., Rimer, S. R., Morgan, M. H. & Zeman, P. (2014) Loading of titanium implants with hydrophilic endosteal surface 3 weeks after insertion: Clinical and radiological outcome of a 12-month prospective clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg* **72**: 1495-1502.

Jensen, T., Schou, S., Svendsen, P. A., Forman, J. L., Gundersen, H. J., Terheyden, H. & Holmstrup, P. (2012) Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with bio-oss and autogenous bone in different ratios: A radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* **23**: 902-910.

Khandelwal, N., Oates, T. W., Vargas, A., Alexander, P. P., Schoolfield, J. D. & Alex McMahan, C. (2013) Conventional sla and chemically modified sla implants in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus--a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res* **24**: 13-19.

- Kokovic, V., Jung, R., Feloutzis, A., Todorovic, V. S., Jurisic, M. & Hammerle, C. H. (2014) Immediate vs. Early loading of sla implants in the posterior mandible: 5-year results of randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **25**: e114-119.
- Lang, N. P., Salvi, G. E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N. & Bosshardt, D. D. (2011) Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res* **22**: 349-356.
- Mansell, J. P., Shiel, A. I., Harwood, C. & Stephens, D. (2017) Alkaline phosphatase binds tenaciously to titanium; implications for biological surface evaluation following bone implant retrieval. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **76**: 472-476.
- Mardas, N., Chadha, V. & Donos, N. (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: A randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **21**: 688-698.
- Morton, D., Bornstein, M. M., Wittneben, J. G., Martin, W. C., Ruskin, J. D., Hart, C. N. & Buser, D. (2010) Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: Two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res* **12**: 9-17.
- Nkenke, E. & Neukam, F. W. (2014) Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: Morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol* **7 Suppl 2**: S203-217.
- Papaspyridakos, P., Mokti, M., Chen, C. J., Benic, G. I., Gallucci, G. O. & Chronopoulos, V. (2014) Implant and prosthodontic survival rates with implant fixed complete dental prostheses in the edentulous mandible after at least 5 years: A systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res* **16**: 705-717.
- Philipp, A., Duncan, W., Roos, M., Hammerle, C. H., Attin, T. & Schmidlin, P. R. (2014) Comparison of sla(r) or slactive(r) implants placed in the maxillary sinus with or

without synthetic bone graft materials--an animal study in sheep. *Clin Oral Implants Res* **25**: 1142-1148.

Rausch-fan, X., Qu, Z., Wieland, M., Matejka, M. & Schedle, A. (2008) Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (mg63) in response to titanium surfaces. *Dent Mater* **24**: 102-110.

Sartoretto, S. C., Alves, A. T., Resende, R. F., Calasans-Maia, J., Granjeiro, J. M. & Calasans-Maia, M. D. (2015) Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci* **23**: 279-287.

Schmitt, C. M., Doering, H., Schmidt, T., Lutz, R., Neukam, F. W. & Schlegel, K. A. (2013) Histological results after maxillary sinus augmentation with straumann(r) boneceramic, bio-oss(r), puros(r), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **24**: 576-585.

Sesma, N., Pannuti, C. & Cardaropoli, G. (2012) Retrospective clinical study of 988 dual acid-etched implants placed in grafted and native bone for single-tooth replacement. *Int J Oral Maxillofac Implants* **27**: 1243-1248.

Shibli, J. A., Grassi, S., de Figueiredo, L. C., Feres, M., Marcantonio, E., Jr., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2007) Influence of implant surface topography on early osseointegration: A histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **80**: 377-385.

Spin-Neto, R., Landazuri Del Barrio, R. A., Pereira, L. A., Marcantonio, R. A., Marcantonio, E. & Marcantonio, E., Jr. (2013) Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res* **15**: 490-497.

Thalji, G., Gretzer, C. & Cooper, L. F. (2013) Comparative molecular assessment of early osseointegration in implant-adherent cells. *Bone* **52**: 444-453.

- Trisi, P., Lazzara, R., Rebaudi, A., Rao, W., Testori, T. & Porter, S. S. (2003) Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol* **74**: 945-956.
- van Velzen, F. J., Ofec, R., Schulten, E. A. & Ten Bruggenkate, C. M. (2015) 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a sla surface: A prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* **26**: 1121-1128.
- Vasak, C., Busenlechner, D., Schwarze, U. Y., Leitner, H. F., Munoz Guzon, F., Hefti, T., Schlottig, F. & Gruber, R. (2014) Early bone apposition to hydrophilic and hydrophobic titanium implant surfaces: A histologic and histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* **25**: 1378-1385.
- Wang, R. E. & Lang, N. P. (2012) Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res* **23 Suppl 6**: 147-156.
- Wennerberg, A., Jimbo, R., Stubinger, S., Obrecht, M., Dard, M. & Berner, S. (2014) Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: A biomechanical study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* **25**: 1041-1050.
- Wu, J., Li, B. & Lin, X. (2016) Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: A systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **45**: 1471-1477.
- Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L. & Boyan, B. D. (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* **74**: 49-58.
- Zinser, M. J., Randelzhofer, P., Kuiper, L., Zoller, J. E. & De Lange, G. L. (2013) The predictors of implant failure after maxillary sinus floor augmentation and

reconstruction: A retrospective study of 1045 consecutive implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **115**: 571-582.

Figures

Fig. 1. Flowchart of the study. The animals were submitted to the surgical procedure of bone defects confection and filling with bone substitutes 60 days before implant placement, which was considered the baseline period. The animals were submitted to euthanasia after 15 and 45 days of the implant installation.

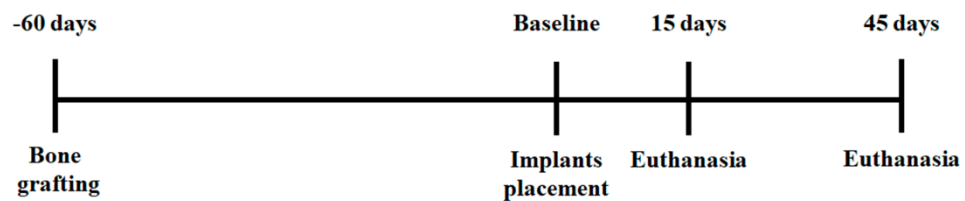


Fig. 2. Representative figures of the decalcified sections of the remaining bone tissue after implant removal torque analysis. No differences were observed in the histological patterns of grafted areas associated with different types of implants. (A-DBB; B-HA/TCP). At 15 days, the formation of an osteoid matrix associated with the presence of rounded osteocytes and active osteoblasts can be observed. In addition, note a great presence of blood vessels and the formation of Haversian canals. (C-DBB; D-HA/TCP). At 45 days, it was observed that the bone tissue of the grafted area was in an advanced stage of maturation. It can be observed the presence of a Haver's channel formed, osteocytes and osteoblasts flattened, and the presence of a few reversion lines and bone tissue with a lamellar appearance (HE-Original augmentation 100X).

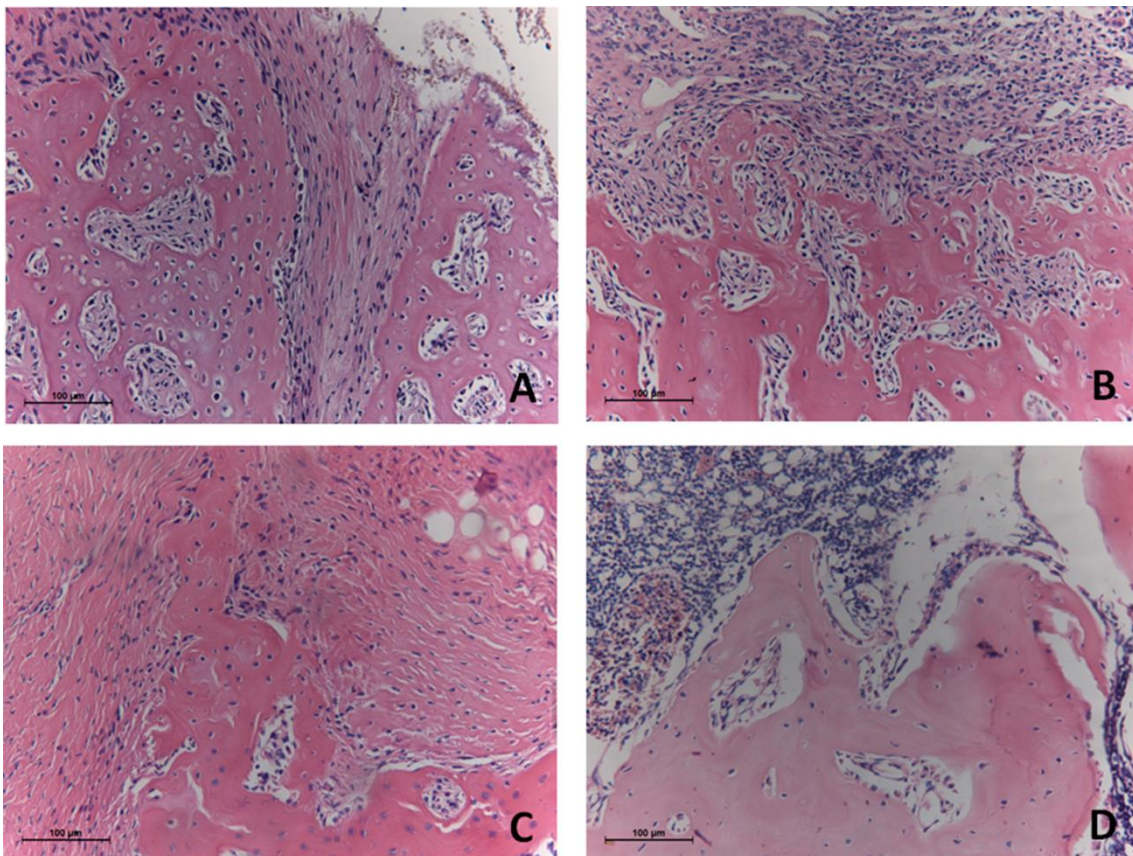


Fig. 3. Representative figures of the non-decalcified sections. The implants with hydrophilic surfaces presented a higher % BIC at both experimental periods and higher % BBT at 45 days compared with the machined surfaces. In addition, a higher percentage of bone in the area surrounding the hydrophilic surface implant was verified than in implants with a machined surface in both evaluation periods; however, the amount of biomaterial was not different between the groups (Stavel's blue and acid fucsin- Original augmentation 100X).

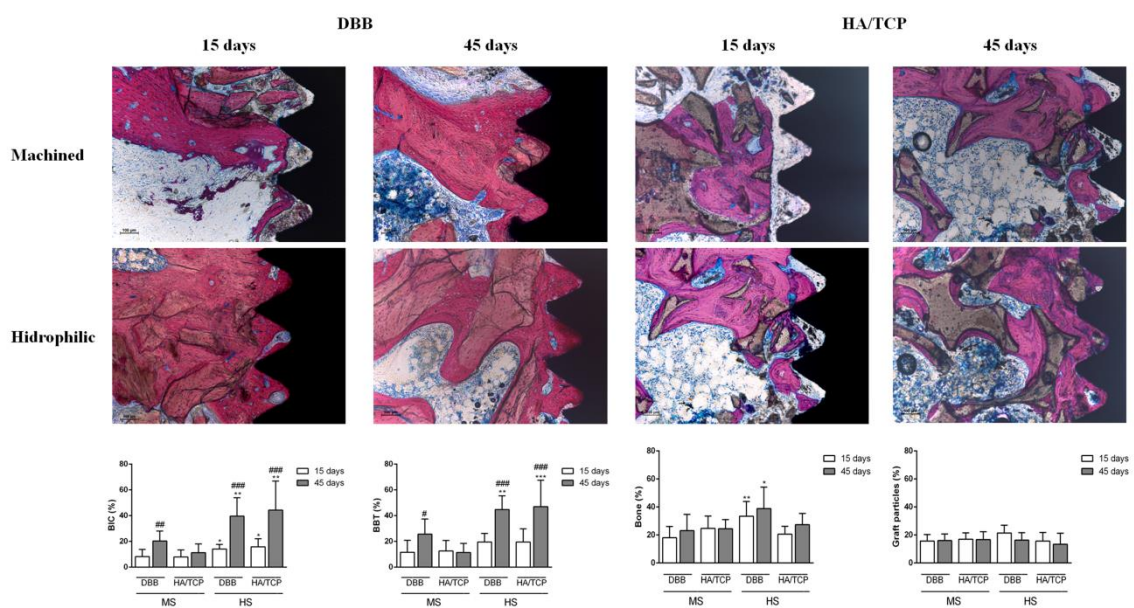
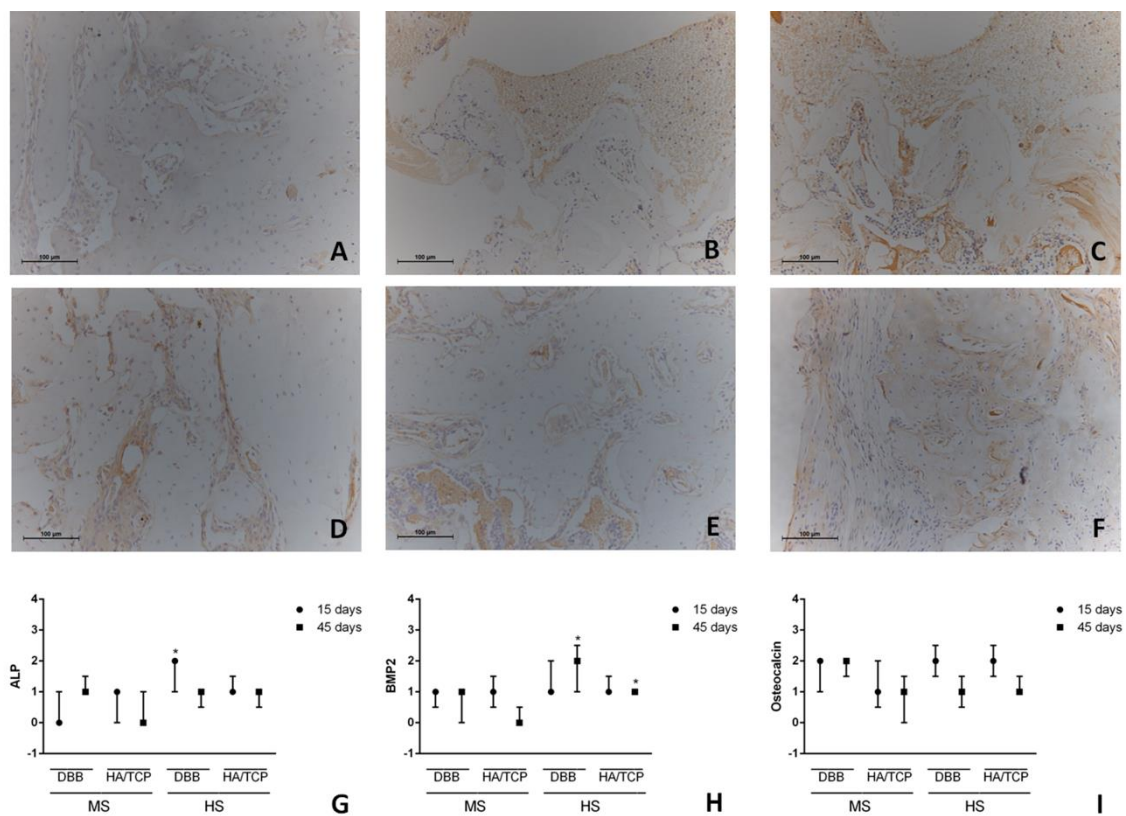


Fig. 4. Representative images and graphs of protein expression analysis. A and D represent images of ALP expression at 15 days in the machined and hydrophilic implant surfaces, respectively. Images B and E represent the images of the BMP-2 expression at 45 days in the machined and hydrophilic implants surfaces, respectively, while images C and F represent the images of the OCN expression at 45 days in the machined and hydrophilic implants surfaces, respectively. A higher BMP-2 expression was observed in the DBB-H and HA/TCP-H groups than in the DBB and HA/TCP groups at the 45-day period. In addition, there was a greater expression of ALP in the DBB-H group compared to the DBB group at the 15-day period. There were no differences in OCN expression between the groups. (Original augmentation-200×).



Tables

Table 1: Mean (Median) and standard deviation of the biomechanical analysis data (Ncm) in all the groups and periods of evaluation.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	2.28 (2.00) \pm 0.48	4.28 (4.00) \pm 1.11 [#]
HA/TCP	1.71 (2.00) \pm 0.48	3.85 (3.00) \pm 2.03 [#]
DBB-H	2.28 (2.00) \pm 0.48	5.71 (5.00) \pm 3.09 [#]
HA/TCP-H	2.71 (3.00) \pm 0.48 [*]	6.57(5.00) \pm 2.69 ^{*#}

* Higher removal torque than the HA/TCP group- Mann-Whitney test; # Higher removal torque than the 15-day period- Teste de Mann-Whitney test.

Table 2: Mean and standard deviation of the BV/TV (%) in all the groups and experimental periods.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	33.10 \pm 4.81	40.46 \pm 5.94 [#]
HA/TCP	27.46 \pm 3.49	37.97 \pm 3.43 [#]
DBB-H	35.76 \pm 7.18	39.17 \pm 2.87 [#]
HA/TCP-H	33.83 \pm 5.65 [*]	44.30 \pm 3.07 ^{*#}

* Higher BV/TV (%) than the HA/TCP group- Unpaired t-test; # Higher BV/TV (%) than the 15-day period- Unpaired t-test.

Table 3: Mean and standard deviation of the %BIC in all the groups and experimental periods.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	8.15 ± 5.69	20.32 ± 7.69 [#]
HA/TCP	7.89 ± 5.47	11.21 ± 6.82
DBB-H	14.08 ± 3.57 [*]	39.60 ± 14.28 ^{*#}
HA/TCP-H	15.75 ± 6.31 [*]	44.33 ± 22.49 ^{*#}

* Higher %BIC than the implants with machined surfaces (DBB and HA/TCP)- Unpaired t-test; # Higher %BIC than the 15-day period- Unpaired t-test

Table 4: Mean and standard deviation of the %BBT in all the groups and experimental periods.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	11.55 ± 9.26	25.64 ± 11.70 [#]
HA/TCP	12.57 ± 8.11	11.37 ± 7.09
DBB-H	19.54 ± 6.68	44.79 ± 10.61 ^{*#}
HA/TCP-H	19.53 ± 10.23	47.05 ± 20.52 ^{*#}

* Higher %BBT than the implants with machined surfaces (DBB and HA/TCP) at the period of 45 days- Unpaired t-test; # Higher %BBT than the 15-day period- Unpaired t-test

Table 5: Mean and standard deviation of the bone area in the vicinity of the implants in all the groups and experimental periods.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	18.03 ± 8.04	23.12 ± 11.61
HA/TCP	24.67 ± 8.87	24.43 ± 6.59
DBB-H	33.41 ± 10.50*	38.87 ± 15.34*
HA/TCP-H	20.62 ± 5.59	27.43 ± 7.96

* Higher bone quantity than around the implants with machined surfaces placed in areas grafted with DBB- Unpaired t-test.

Table 6: Mean and standard deviation of the bone substitute remnants in the vicinity of the implants in all the groups and experimental periods.

Groups/Period	15 days	45 days
DBB	15.67 ± 4.68	16.03 ± 4.67
HA/TCP	17.04 ± 4.55	16.67 ± 5.71
DBB-H	21.42 ± 5.52	16.30 ± 5.42
HA/TCP-H	15.69 ± 6.13	13.36 ± 7.91

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, foi verificado no presente estudo que a superfície de implante hidrofílica promoveu um melhor padrão de osseointegração em áreas enxertadas com DBB e HA/TCP em comparação com as superfícies usinadas. Os resultados da análise histométrica demonstraram que os implantes com superfície hidrofílica tiveram uma maior %BIC e %BBT em relação aos implantes com superfície usinadas nas áreas enxertadas com ambos os biomateriais. Esse resultado corrobora com estudos anteriores que demonstraram que implantes com superfície modificada apresentam maior contato osso-implante do que implantes com superfície usinada em áreas de osso nativo^{39,40}. Tem sido justificado que a aceleração da osseointegração promovido por essa superfície hidrofílica é devido a imersão dos implantes em uma substância salina que protege a superfície do implante do ar atmosférico, prevenindo a contaminação por carbono e hidrocarbonetos e assim evitando a perda de energia da superfície e melhorando a sua molhabilidade^{26,27,37}.

Foi observado que a utilização dos implantes com superfície hidrofílica teve um impacto maior nas áreas enxertadas com HA/TCP do que nas áreas enxertadas com DBB, onde foi verificado um aumento do contra-torque de remoção e maior volume de tecidos mineralizados ao redor dos implantes com superfície hidrofílica instalados apenas nas áreas enxertadas com HA/TCP. A ausência de diferenças desses parâmetros nas áreas enxertadas com DBB pode ser devido ao maior potencial de osteocondução promovida por esse biomaterial em relação a HA/TCP. De fato, estudos anteriores demonstraram que houve um maior contato entre osso e as partículas remanescentes de DBB do que nas partículas de HA/TCP^{13,41} que pode ter aumentado a resistência mecânica das áreas enxertadas com DBB em relação as áreas enxertadas do HA/TCP. Além disso, tem sido demonstrado em estudos clínicos que o DBB apresenta maiores

remanescentes de biomaterial do que o HA/TCP^{6,41} e essa característica pode ter influenciado no volume de tecido mineralizado ao redor dos implantes. Dessa forma, é provável que o impacto da utilização de superfícies hidrofílicas seja mais nítido em áreas enxertadas com biomateriais com potencial osteocondutor menor tal como demonstrado nesse estudo. A investigação do efeito das superfícies hidrofílicas em áreas enxertadas com outros tipos de biomateriais osteocondutores deverá ser realizada no futuro.

O aumento da osseointegração dos implantes com superfície hidrofílica nas áreas enxertadas com DBB e HA/TCP esteve associado ao aumento da expressão das proteínas BMP2 e ALP associado ao osso vizinho desses implantes em comparação aos implantes com superfície usinada. Essas proteínas estão relacionadas com o aumento da diferenciação e da função osteoblástica^{42,43,44} e estão relacionados com a formação do tecido ósseo. De fato, estudos in vitro com culturas de células da linhagem osteoblástica demonstraram que as superfícies de implante hidrofílicas favorecem a interação do implante com as proteínas importantes para formação de tecido ósseo tais como VEGF, ALP, OPG, TGF β 1⁴⁵, o que favorece a adesão, proliferação, diferenciação e ativação da atividade osteoblástica^{46,47}.

A melhora no padrão de osseointegração das superfícies hidrofílicas nas áreas enxertadas pode representar clinicamente a redução no tempo de espera para a aplicação do carregamento protético em uma área que é caracterizada por reduzidas propriedades mecânicas em comparação a áreas de osso nativo. Apesar desses resultados promissores, deve-se destacar que esse estudo apresenta limitações tal como a comparação da superfície hidrofílica com uma superfície usinada pois atualmente a utilização desse último tipo de superfície não é uma prática clínica corriqueira sendo que dessa forma a comparação da osseointegração em áreas enxertadas com outros tipos

de superfícies modificadas deverá ser investigado. Para que a inferência em relação a redução do tempo clínico para instalação de implantes seja comprovada, será necessário a utilização de modelos que induzam a aplicação de cargas em implantes com superfície hidrofílica em áreas enxertadas em comparação a implantes com outros tipos de superfície. Além disso, o efeito da superfície hidrofílica sobre a osseointegração em áreas enxertadas com outros tipos de biomaterial é incerto.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que implantes com superfície hidrofílica apresentam melhor padrão de osseointegração em áreas enxertadas com DBB e HA/TCP do que implantes com superfície usinada.

REFERÊNCIAS*

1. Papaspyridakos P, Mokti M, Chen CJ, Benic GI, Gallucci GO, Chronopoulos V. Implant and prosthodontic survival rates with implant fixed complete dental prostheses in the edentulous mandible after at least 5 years: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014; 16(5): 705-17.
2. Galindo-Moreno P, Nilsson P, King P, Worsaae N, Schramm A, Padiál-Molina M, et al. Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter implants: 5-year follow-up of a multicenter prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28(12): 1584-91.
3. Benic GI, Hammerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000.* 2014; 66(1): 13-40.
4. Wang RE, Lang NP. Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23 Suppl 6: 147-56.
5. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000.* 2008; 47: 172-92.
6. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann(R) BoneCeramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(5):576-85.
7. Jensen T, Schou S, Svendsen PA, Forman JL, Gundersen HJ, Terheyden H, et al. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(8): 902-10.
8. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol.* 2014; 7 Suppl 2:S203-17.
9. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(7): 688-98.
10. Wu J, Li B, Lin X. Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 45(11): 1471-7.
11. Sesma N, Pannuti C, Cardaropoli G. Retrospective clinical study of 988 dual acid-etched implants placed in grafted and native bone for single-tooth replacement. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 27(5): 1243-8.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Zinser MJ, Randelzhofer P, Kuiper L, Zoller JE, De Lange GL. The predictors of implant failure after maxillary sinus floor augmentation and reconstruction: a retrospective study of 1045 consecutive implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 115(5): 571-82.
13. Antunes AA, Oliveira Neto P, de Santis E, Caneva M, Botticelli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss((R)) and Straumann((R)) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(2): 135-42.
14. Liu HY, Zheng H, Hou XP, Zhong WJ, Ying XX, Chai SL, et al. Bio-Oss((R)) for delayed osseointegration of implants in dogs: a histological study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 52(8): 729-34.
15. Pang C, Ding Y, Zhou H, Qin R, Hou R, Zhang G, et al. Alveolar ridge preservation with deproteinized bovine bone graft and collagen membrane and delayed implants. *J Craniofac Surg.* 2014; 25(5): 1698-702.
16. Philipp A, Duncan W, Roos M, Hammerle CH, Attin T, Schmidlin PR. Comparison of SLA(R) or SLActive(R) implants placed in the maxillary sinus with or without synthetic bone graft materials--an animal study in sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(10): 1142-8.
17. Rickert D, Vissink A, Slot WJ, Sauerbier S, Meijer HJ, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation surgery with BioOss(R) mixed with a bone marrow concentrate or autogenous bone: test of principle on implant survival and clinical performance. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 43(2): 243-7.
18. Jensen SS, Aaboe M, Janner SF, Saulacic N, Bornstein MM, Bosshardt DD, et al. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: a histomorphometric study in minipigs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17(2): 274-85.
19. Mellati E, Chen S, Davies H, Fitzgerald W, Darby I. Healing of Bio-Oss(R) grafted marginal gaps at implants placed into fresh extraction sockets of incisor teeth in dogs: a study on the effect of submerged vs. non-submerged healing. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(5): 553-62.
20. Dos Anjos TL, de Molon RS, Paim PR, Marcantonio E, Marcantonio E, Jr., Faeda RS. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: a prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 45(12): 1556-63.
21. Nedir R, Nurdin N, Khoury P, Bischof M. Short implants placed with or without grafting in atrophic sinuses: the 3-year results of a prospective randomized controlled study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016; 18(1): 10-8.
22. Tran DT, Gay IC, Diaz-Rodriguez J, Parthasarathy K, Weltman R, Friedman L. Survival of dental implants placed in grafted and nongrafted bone: a retrospective Study in a University Setting. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 31(2): 310-7.

23. De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Rangel Garcia I, Jr., Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss(R) or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28(5): 503-11.
24. Buser D, Brogгинi N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004; 83(7): 529-33.
25. van Velzen FJ, Ofec R, Schulten EA, Ten Bruggenkate CM. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(10): 1121-8.
26. Wennerberg A, Jimbo R, Stubinger S, Obrecht M, Dard M, Berner S. Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(9): 1041-50.
27. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol* 2000. 2017; 73(1): 22-40.
28. 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.
29. Hinkle RM, Rimer SR, Morgan MH, Zeman P. Loading of titanium implants with hydrophilic endosteal surface 3 weeks after insertion: clinical and radiological outcome of a 12-month prospective clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72(8): 1495-502.
30. Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(6): 631-8.
31. Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(1): 78-86.
32. Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Herten M, Wieland M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(1): 64-75.
33. Bornstein MM, Wittneben JG, Bragger U, Buser D. Early loading at 21 days of non-submerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: 3-year results of a prospective study in the posterior mandible. *J Periodontol.* 2010; 81(6): 809-18.

34. Morton D, Bornstein MM, Wittneben JG, Martin WC, Ruskin JD, Hart CN, et al. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12(1): 9-17.
35. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(4): 349-56.
36. Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C. Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus--a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(1): 13-9.
37. Vasak C, Busenlechner D, Schwarze UY, Leitner HF, Munoz Guzon F, Hefti T, et al. Early bone apposition to hydrophilic and hydrophobic titanium implant surfaces: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(12): 1378-85.
38. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol.* 2003; 74(7): 945-56.
39. Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol.* 2006; 77(10): 1736-43.
40. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(8): 796-803.
41. Fahmy-Garcia S, van Driel M, Witte-Buoma J, Walles H, van Leeuwen JP, van Osch G, et al. Nell-1, HMGB1 and CCN2 enhance migration and vasculogenesis, but not osteogenic differentiation compared to BMP2. *Tissue Eng Part A.* 2018 ; 24(3-4): 207-21.
42. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85A(8): 1544-52.
43. Mansell JP, Shiel AI, Harwood C, Stephens D. Alkaline phosphatase binds tenaciously to titanium; implications for biological surface evaluation following bone implant retrieval. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 76: 472-6.
44. Rausch-fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dent Mater.* 2008; 24(1): 102-10.
45. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 74(1): 49-58.

46. Thalji G, Gretzer C, Cooper LF. Comparative molecular assessment of early osseointegration in implant-adherent cells. *Bone*. 2013; 52(1): 444-53.
47. de Oliveira GJ, de Paula LG, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Spolidorio LC, Marcantonio EJr., et al. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 29(4): 949-57.

APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado na Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr Unesp) (CEUA: 26/2016 – ANEXO A). Para esse estudo foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus*, variação Hotzman) com 12 semanas de idade, com peso entre 250–300 g. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlados. Foram oferecidos aos animais água e ração *ad libitum*. Esse estudo foi conduzido de acordo com o protocolo ARRIVE para conduta de estudos pré-clínicos.

Grupos

Os 56 animais que foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com 14 animais cada, que foram divididos de acordo com o tipo de biomaterial e implante que foram utilizados: **Grupo DBB:** Defeito preenchido com osso bovino desproteínizado (Bio-Oss®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) e instalação de implante com superfície usinada (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil); **Grupo HA/TCP:** Defeito preenchido com β -fosfato de cálcio/Hidroxiapatita (Straumann® Bone Ceramic, Straumann AG, Basel, Switzerland) e instalação de implante com superfície usinada; **Grupo DBB-H:** Defeito preenchido com osso bovino desproteínizado e instalação de implante com superfície hidrofílica modificada por jateamento de óxidos e ataque ácido e mantida em solução de cloreto de sódio (Superfície ACQUA, Neodent®, Curitiba, PR, Brasil); **Grupo HA/TCP-H:** Defeito preenchido com β -fosfato de cálcio/Hidroxiapatita e instalação de implante com superfície hidrofílica.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 0,08 ml/100g de massa corporal com Xilazina (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 0,04 ml/100g de massa corporal. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia da região interna das patas posteriores direita e esquerda e foi realizada a antissepsia.

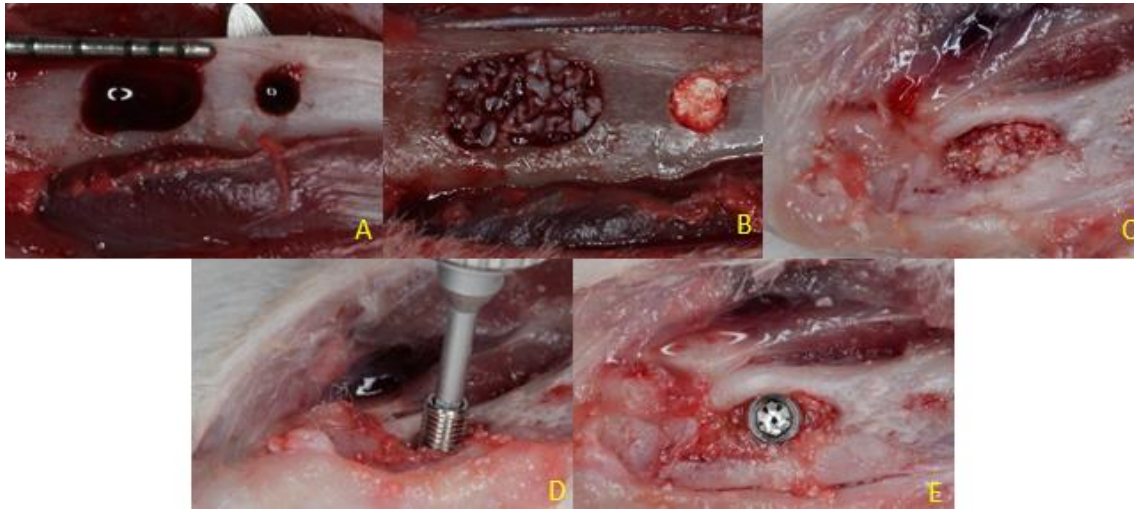
Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada, em planos, sobre a tuberosidade da tíbia. Após dissecação delicada, o tecido ósseo foi submetido à osteotomia, por meio de uma broca esférica montada em contra ângulo com auxílio de um motor elétrico ajustado a 1200 rpm (BLM 600 – Driller, São Paulo, SP, Brasil) sob abundante irrigação com solução salina estéril. O defeito formado teve como medidas finais 4mm de comprimento e de largura e 1.5mm de profundidade, sendo que os mesmos foram posteriormente preenchidos com os biomateriais (Figura 1 A-B). O tecido foi suturado por planos internamente com fio reabsorvível 5.0 (Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Os animais receberam, em dose única, penicilina associada à estreptomicina na dosagem 0.1 ml/kg de peso (Multibiótico Small, Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, MG, Brasil) e 0.1 ml/kg de peso de cetoprofeno (Ketoflex; Mundo Animal, São Paulo, Brasil) por via intramuscular.

Após um período de 60 dias, foi realizado uma segunda intervenção cirúrgica na região que recebeu os biomateriais para instalação dos implantes (Figura 1 C). Uma incisão semelhante ao primeiro procedimento foi realizada sobre a tuberosidade da tíbia. A região enxertada foi preparada para instalação dos implantes por meio da aplicação de

uma sequência progressiva de fresas (fresa lança; fresa espiral de 2.0 mm – Neodent®; Curitiba, PR, Brasil) para acomodar um implante de titânio com 4 mm de altura por 2.2 mm de diâmetro (Superfícies usinadas e Acqua, Neodent®, Curitiba, PR, Brasil). Todas as perfurações foram realizadas com auxílio de um motor elétrico, ajustado a 1200 rpm, sob abundante irrigação com solução salina estéril. O implante foi instalado com a ajuda de uma chave digital (Chave digital hexagonal 1.2mm – Neodent, Curitiba, PR, Brasil) (Figura 1 D-E). A sutura dos tecidos e o protocolo medicamentoso pós-operatório que foi utilizado foi semelhante ao utilizado na primeira cirurgia.

Nos períodos de 15 e 45 dias após os procedimentos cirúrgicos de instalação dos implantes (Figura 2), os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento da dose de anestésico. As tíbias foram separadas de acordo com as análises executadas. A tíbia direita foi utilizada para as análises microtomográficas e histomorfométrica, enquanto que a tíbia esquerda foi utilizada para as análises biomecânicas, descrição histológica e análise imuno-histoquímica.

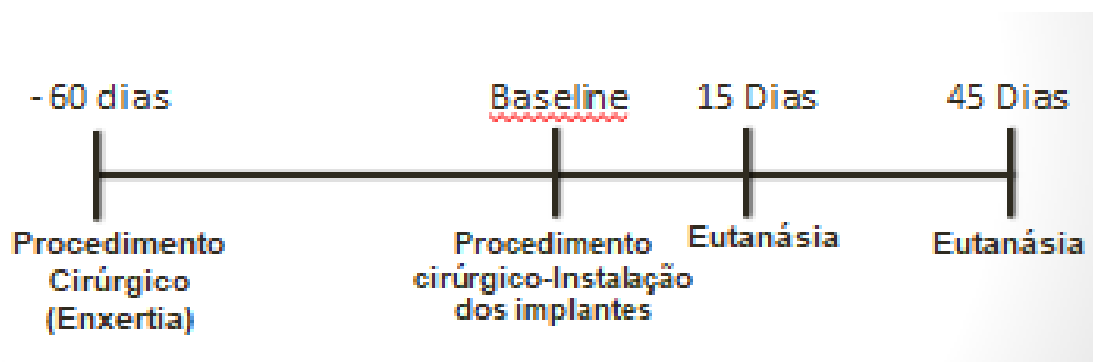
Figura 1 - Figura demonstrativa das etapas da cirurgia realizadas nas tíbias dos animais.



(A) – Defeito não -crítico confeccionado na tíbia; (B) – Preenchimento do defeito com biomaterial, e marcação com guta-percha, para melhor localização do defeito durante a análise de micro-CT; (C) – Leito cirúrgico após 60 dias do procedimento de confecção do defeito e posterior preenchimento com biomaterial; (D) – Instalação do implante utilizando uma chave digital hexagonal de 1.2mm; (E) – Implante em posição.

Fonte: Autoria própria

Figura 2 - Fluxograma do estudo.



Fonte: Autoria própria.

Avaliação Biomecânica

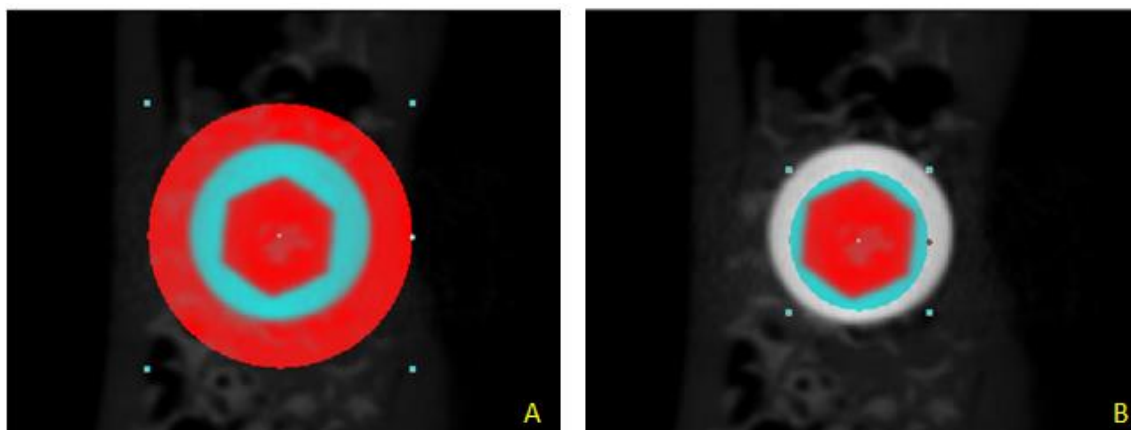
Após a eutanásia as tíbias esquerdas foram estabilizadas em uma pequena morsa. Uma chave hexagonal foi conectada tanto no implante como no torquímetro (Tohnichi, modelo ATG24CN-S, Toquio, Japão - com escala graduada de 0.05 N/cm, medindo a força de 3 a 24 Ncm) e foi realizado um movimento anti-horário com o objetivo de desrosquear o implante. O pico máximo necessário para movimentar o implante foi anotado como o valor do torque de remoção.

Avaliação microtomográfica

As tíbias direitas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas e posteriormente armazenadas em Álcool 70°. Essas amostras foram escaneadas por um microtomógrafo (Skyscan, Aatselaar, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12.45; Potência do tubo de raio-x: 65 kVP, intensidade do raio-x: 385 μ A, tempo de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm e tamanho do voxel: 18 μ m³. As imagens foram reconstruídas, reposicionadas espacialmente e analisadas por softwares específicos (NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Bélgica). A região de interesse (ROI) foi definida como uma região circular com 0,5 mm em torno de todo o diâmetro do implante. Esse ROI foi definido como Volume Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- 4,5 mm x 3,2 mm). Como os implantes colocados não receberam o *cover screw* em alguns casos houve a formação óssea dentro da plataforma protética. Para que esta formação óssea não interferisse com a análise do volume de tecido mineralizado ao redor do implante foi definido um segundo ROI para remoção do volume da plataforma (Figura 3). Com os resultados obtidos nos dois ROIs, foi possível definir o volume de formação óssea utilizando a fórmula: Volume Total – Volume

Plataforma = Volume de tecidos mineralizados. O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, e os valores do volume do tecido mineralizado ao redor dos implantes foi obtido na forma de porcentagem. Um examinador treinado e cego para os grupos experimentais executou essa análise.

Figura 3 - Figura representativa dos ROIs utilizados para realização da análise microtomográficas, (A) – ROI maior e (B) – ROI menor.



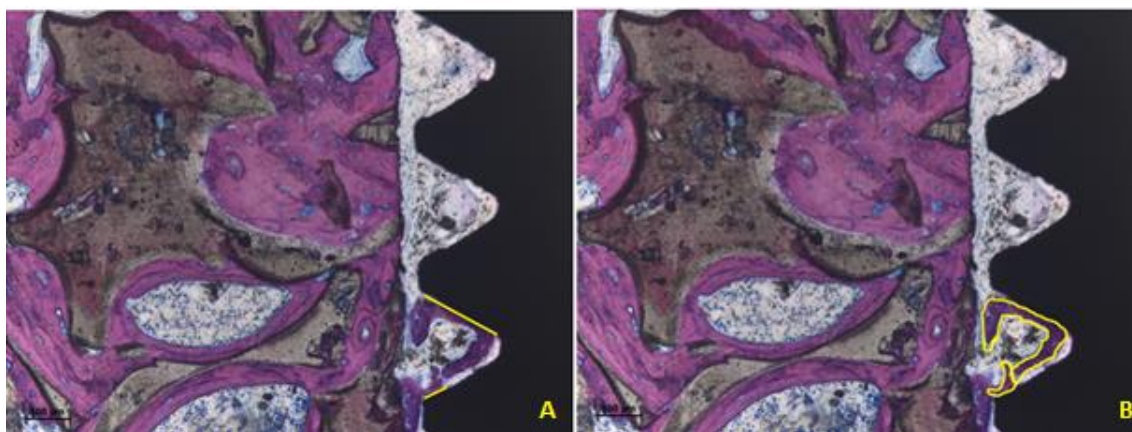
Fonte: Autoria própria.

Avaliação Histomorfométrica e descrição histológica

Após o escaneamento, as tíbias direitas foram desidratadas em uma série crescente de etanóis (60 – 100%) e infiltradas e polimerizados em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & CO, Wehrheim, Alemanha). Os blocos contendo o implante e o tecido ósseo foram cortados em um ponto central usando um sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As secções finais apresentaram aproximadamente 45 μm de espessura e foram coradas com azul de Stevenel associado a fucsina ácida e analisadas em um microscópio óptico (DIASTAR – Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha)

com o aumento de 100X. As avaliações histomorfométricas foram realizadas com o software para análise de imagem (Image J, San Rafael, CA, EUA). As porcentagens de contato osso-implante (%BIC) (Figura 4A) e de área óssea entre espiras (%BBT) (Figura 4B) foram avaliadas separadamente nas seis primeiras roscas dos implantes. Também foi executado análise da quantidade de osso e biomaterial em porcentagem em uma região vizinha das 6 roscas avaliadas bilateralmente (Figura 5A-B). Essas análises foram realizadas por um examinador cego e treinado.

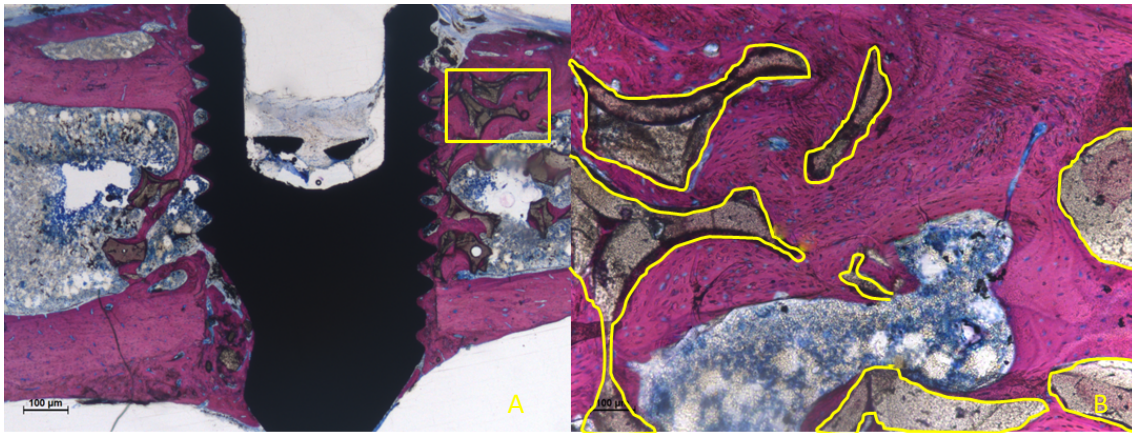
Figura 4 – Análise Histométrica



(A) Figura representativa mostrando como foi mensurado o contato osso implante (BIC) na análise histométricas. (B) Figura representativa mostrando como foi mensurado a área óssea dentro das roscas (BBT) do implante na análise histométrica (Aumento original 100 X- Azul de Stevenel's com fucsina ácida).

Fonte: Autoria própria

Figura 5 - Figura representativa mostrando como foi mensurado a quantidade de biomaterial em uma região vizinha das 6 roscas avaliadas bilateralmente.



(A): Área aonde foi executado a análise na vizinhança dos implantes para mensuração da composição da área enxertadas (Aumento original 25 X- Azul de Stevenel's com fucsina ácida) (B): Mensuração da área dos biomateriais (circunscrita em amarelo) dentro do tecido enxertado (Aumento original 100 X- Azul de Stevenel's com fucsina ácida).

Fonte: Autoria própria

As tíbias que tiveram os implantes removidos foram fixadas em paraformaldeído 4 % por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um período de 8 semanas. Posteriormente as amostras foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As secções foram realizadas paralelas ao longo eixo do sítio ao qual o implante foi inserido. Os cortes com espessura de 4 μ m foram fixados em lâminas comuns (para coloração com hematoxilina-eosina) e silanizadas (para análise imuno-histoquímica)

Foi avaliado na descrição histológica o aspecto do tecido ósseo, com destaque para o processo de remodelação e maturação óssea. As avaliações foram realizadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais com auxílio de um

microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha) com o aumento de 100X e 200X.

Avaliação Imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada para identificar e localizar a expressão de proteínas relacionadas com a remodelação óssea: Osteocalcina (OCN), proteína morfogênica óssea 2 (BMP2) e fosfatase alcalina (ALP). Os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas, seguido de tramitação laboratorial de rotina para deparafinização e reidratação. Em seguida os cortes foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA) a 3% por 120 minutos. Logo após os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários de OCN (1:400); BMP2 (1:400) e ALP (1:800) (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como controle negativo, os cortes histológicos foram tratados por PBS a 1%. Posteriormente os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados pela diaminobenzidina (DAB) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Os cortes foram contra-corados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos celulares. As imagens foram obtidas através de uma câmera acoplada a um microscópio de luz (Leica-Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany). As análises da expressão de todos os anticorpos foram executadas através um índice de extensão de marcação proteica⁴⁷ que foi executada na referente a metade coronal do leito cirúrgico dos implantes: (0) sem marcação (0% das células/matriz); (1) marcação fraca (<25% das células/matriz); (2) marcação moderada (<50% das células/matriz); (3) marcação forte (<75% das células/matriz). As análises foram executadas por um examinador cego e treinado para essa análise (GJO).

Análise estatística

O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística desse estudo. Os dados gerados pelas análises histométricas, microtomográfica foram dados numéricos, dessa forma foram submetidos ao teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. Os dados das análises biomecânicas não foram normais e foram analisados por meio do teste de não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados das análises microtomográficas e histométricas foram normais e foram analisados por meio do teste paramétrico t-não pareado. Os dados gerados pela análise imunohistoquímica foram qualitativos, e dessa forma foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Todos os testes desse estudo foram aplicados com nível de significância de 95%.

ANEXO A



unesp

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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**ANÁLISE DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES COM SUPERFÍCIE AQUA EM ÁREAS ENXERTADAS: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM RATOS**", registrada com o nº 26/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** – 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 30/03/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzmann
Nº de animais	56
Peso/Idade	250-300g – 12 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara

Elisa Maria Ap. Giro
Profa. Dra. ELISA MARIA APARECIDA GIRO
Vice-coordenador da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho até 19/03/2020.

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 19/03/2018

FELIPE EDUARDO PINOTTI