

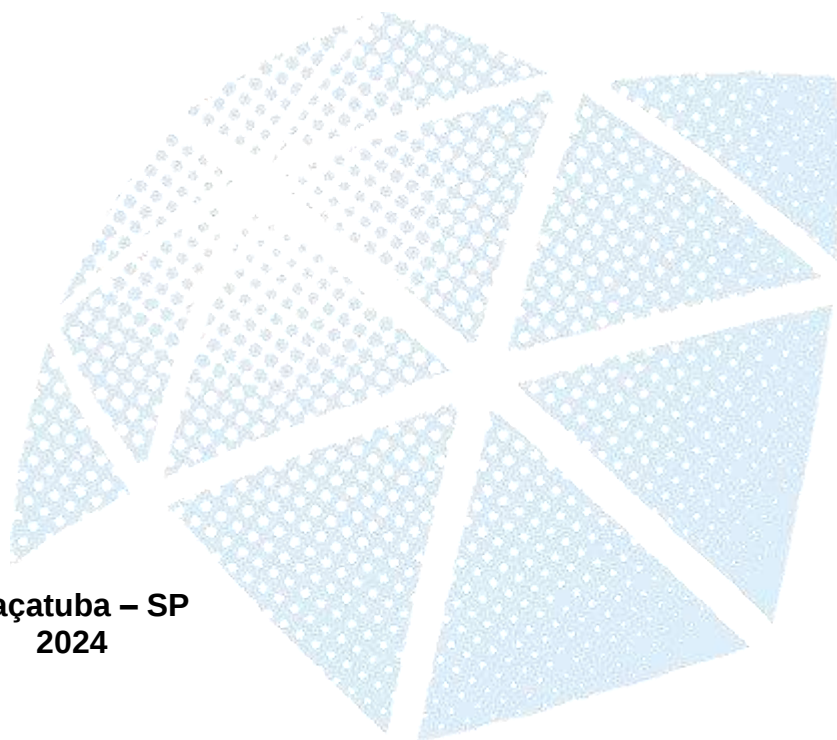


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

CAROLINE LIBERATO MARCHIOLLI

**Estudo da resposta biológica de uma superfície de titânio
revestida com odanacatib: análise de molhabilidade e
biocompatibilidade. Estudo in vitro e in vivo**

**Araçatuba – SP
2024**



CAROLINE LIBERATO MARCHIOLLI

**Estudo da resposta biológica de uma superfície de titânio
revestida com odanacatib: análise de molhabilidade e
biocompatibilidade. Estudo in vitro e in vivo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Profº. Associado Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

**Araçatuba – SP
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M317e Marchioli, Caroline Liberato.
Estudo da resposta biológica de uma superfície de
titânio revestida com odanacatib : análise de molhabilidade e biocompatibilidade. Estudo in vitro e in vivo /
Caroline Liberato Marchioli. - Araçatuba, 2024
68 f.: il.; tab.

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

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

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico este trabalho e todos os momentos importantes da minha vida, aos meus pais Ismael e Márcia. Obrigada pela educação, ética, respeito e amor que sempre tive como exemplo dentro e fora de casa. Obrigada por toda confiança e amor. E ao Bingo, Sushi, Amora, Nala, Bisteca e Logan, minhas fontes de amor.

*Agradecimentos
Especiais*

*A **Deus**, neste momento de reflexão, quero expressar minha profunda gratidão por todas as bênçãos que tens derramado sobre a minha vida. Agradeço por cada respiração, por cada novo amanhecer e por todas as experiências que moldaram quem sou. Obrigada por estar sempre ao meu lado, guiando-me nos momentos difíceis e celebrando comigo nas alegrias. Reconheço a Tua bondade em cada detalhe da minha jornada, e sou grata pela graça que me é concedida diariamente. Que o meu coração permaneça aberto à Tua vontade, e que eu possa continuar a crescer em fé, amor e compaixão. Agradeço por seres o farol que ilumina o meu caminho.*

*Aos meus pais, **Ismael Marchioli e Marcia Marchioli**, a minha profunda gratidão a vocês. Agradeço do fundo do meu coração por todo o amor, apoio e sacrifício que têm dedicado à minha vida. Vocês são os alicerces da minha jornada, proporcionando-me orientação, encorajamento e segurança. Cada conselho, cada sorriso, e até mesmo cada desafio que enfrentamos juntos moldaram a pessoa que sou hoje. Agradeço por todos os esforços, sacrifícios e momentos de alegria compartilhados. Vocês são fontes inesgotáveis de amor e inspiração. Saibam que a vossa dedicação não passa despercebida e é infinitamente valorizada. Amo vocês mais do que as palavras podem expressar. Que a vida continue a nos presentear com momentos preciosos.*

*A minha avó, **Maria Dulcinea** e a minha madrinha, **Rita de Cássia**, minha profunda gratidão a duas mulheres extraordinárias que têm sido pilares fundamentais na minha vida. A minha Maria, sua sabedoria, carinho e paciência são fontes constantes de inspiração. Suas histórias e conselhos moldaram a minha visão de mundo, e sua presença é uma bênção que me enche de alegria. A minha tia/madrinha, agradeço por ser mais do que uma figura de apoio; você é minha guia e amiga. Seu apoio incondicional e amor constante são como uma luz*

orientadora em minha vida, e sou imensamente grato por tê-la ao meu lado. Ambas desempenham papéis únicos e especiais na minha jornada, e cada momento compartilhado é um tesouro. Agradeço por todas as lições, risos e amor que têm dedicado a mim.

*A minha irmã, **Larissa Marchioli**, minha primeira e única melhor amiga, por todo companheirismo e amizade, por estar sempre por perto oferecendo o melhor ombro e abraço do mundo, sou grata a você e ao meu cunhado **Henry Mota**, por todo apoio dedicado.*

*Aos meus avós, **Arlindo Marchioli** (in memoriam) e **Aparecida Marchioli** (in memoriam). Jamais esquecerei daqueles que me deram amor e acreditaram em mim, vocês serão para sempre simbologia de um amor eterno.*

*Aos meus tios, **Leal** (in memoriam), **Iolanda**, **Marcus**, **Aparecida** e aos meus primos, **Marcelle**, **Gabriel**, **Rodrigo** e **Juliana**, por todo o amor, pela nossa união, pela nossa família, que mesmo distante consigo sentir o amor de vocês por perto*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, minha sincera gratidão pela sua orientação e apoio ao longo deste período. Sua dedicação e expertise foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Suas orientações perspicazes, paciência e encorajamento constante foram verdadeiramente inspiradores. Cada conversa e conselho foram como faróis que iluminaram o caminho do meu aprendizado, e sou imensamente grata por isso. Agradeço por investir seu tempo e esforço em meu desenvolvimento, por compartilhar seu conhecimento e por ser um guia excepcional. Sua contribuição fez toda a diferença em minha jornada acadêmica e deixará uma marca duradoura em minha carreira.*

*Ao **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, a medida que reflito sobre minha jornada acadêmica e pessoal, não posso deixar de expressar minha profunda gratidão a você. Sua presença na minha vida como professor e amigo tem sido uma bênção extraordinária. Seu comprometimento com o ensino vai além da sala de aula, transcende as fronteiras formais e cria um ambiente de aprendizado único. Sua paciência, compreensão e amizade transformaram não apenas a minha experiência educacional, mas também a minha perspectiva sobre a vida. Agradeço por cada conselho sábio, por cada momento compartilhado e por cada desafio superado juntos. Sua dualidade como educador e amigo tornou minha jornada mais rica, significativa e memorável. Que esta expressão de gratidão alcance você de maneira tão profunda quanto sua influência tem impactado a minha vida.*

*A **Prof. Dra. Roberta Okamoto**, minha profunda gratidão por sua dedicação e comprometimento conosco. Sua presença vai muito além da transmissão de conhecimento; é uma fonte de inspiração para seus alunos. Sua paixão pelo que faz reflete-se em cada lição, e sou verdadeiramente grata por ter tido a oportunidade de ser sua aluna, e conviver de perto. Agradeço por seu tempo, paciência e pelo impacto positivo. Suas orientações e conselhos moldaram todo meu trajeto e contribuíram significativamente para o meu crescimento. Que sua dedicação continue a influenciar positivamente nossas vidas, inspirando a busca pelo conhecimento e excelência.*

*A **Prof. Dra. Luciana Simonato**, encontrar em uma professora que também se tornou minha amiga é um privilégio raro e extraordinário. Quero dedicar um momento para expressar minha profunda gratidão por sua presença incrível na minha vida. Suas aulas foram mais do que fontes de conhecimento; foram momentos de inspiração, aprendizado e risos compartilhados. Sua capacidade de tornar o ambiente educacional não apenas informativo,*

mas também acolhedor, é verdadeiramente notável. Agradeço não apenas pelo que ensinou em sala de aula, mas também pela amizade genuína que compartilhamos. Seu apoio, orientação e conselhos têm sido inestimáveis, e sou verdadeiramente grata por ter uma professora que é também uma amiga tão incrível. Que esta relação especial continue a crescer e florescer. Obrigada por ser mais do que uma professora, por ser minha amiga e mentora.

*Ao **Prof. Dr. Francisley Avila de Souza** por ser a maior representação de um pai que temos por aqui. O senhor carrega todo o “bloco 5” em baixo dos braços como se realmente fossem seus filhos. Obrigada pelos inúmeros cafés, por se importar verdadeiramente com o nosso bem-estar, por todos conselhos e cuidado, por estar sempre disponível. Obrigada por toda colaboração, todo auxílio de todos do grupo do senhor, sempre foi muito importante. Muito obrigada, professor.*

*Ao **Dr. Atair Carvalho e Juarez Barcelos**, primeiramente por terem acreditado em mim como estagiária, todos os dias que estive com vocês foram de aprendizados. Agradeço a oportunidade e o privilégio. Lembro com carinho de todas as questões ou desafios superados de aprendizados vivenciados. Acredito que essa experiência moldou meu caráter e habilidades, preparando-me para os desafios futuros como Cirurgiã-dentista. Obrigada por serem uma figura inspiradora e por terem sido parte fundamental do meu início profissional. Jamais esqueço de vocês e de toda equipe.*

*Ao grupo de pesquisa: **Natália Sanches, Lara Cervantes, Sara Berton, Maria Cristina Ruiz e Estéfany do Prado**, gostaria de expressar minha profunda gratidão a cada um de vocês pelo incrível trabalho e dedicação que compartilhamos em nosso grupo. Trabalhar com pessoas tão talentosas e comprometidas tem sido uma experiência enriquecedora e*

recompensadora. Cada um de vocês trouxe uma vivência e experiência única, contribuindo para o sucesso e a qualidade de nossos projetos. A colaboração e o espírito de equipe que compartilhamos são verdadeiramente inspiradores. Agradeço por todos os esforços, ideias inovadoras e pela atmosfera positiva que criamos juntos. Cada desafio superado fortaleceu nossa união e resiliência como equipe de pesquisa. Que continuemos a trabalhar juntos, explorando novas fronteiras e alcançando resultados significativos. Sou verdadeiramente grata por fazer parte deste grupo excepcional.

*A, **Natalia Sanches**, mesmo à distância no momento, sua presença na minha vida é uma fonte constante de alegria e conforto. Minha profunda gratidão por ser uma amiga incrível, mesmo estando longe, nunca saiu verdadeiramente de perto. Obrigada por sua constante bondade, apoio e amor. Sinto sua presença de maneira significativa em cada mensagem, ligação e pensamento compartilhado. Obrigada por sua lealdade, compreensão e por ser alguém em quem posso confiar, independentemente do lugar ou situação que nos separa. Sua amizade é luz em meus dias e uma prova de que as verdadeiras amizades superam qualquer barreira, é um presente. Que a vida nos reserve oportunidades e situações para nos reunirmos. Até lá, agradeço por cada momento compartilhado e por continuar a ser essa amiga maravilhosa. Saudades todos os dias, minha eterna dupla dinâmica.*

*À **Lara Cervantes**, minha “irmã mais velha”, por me receber tão bem, por toda oportunidade acadêmica e clínica, por toda amizade que construímos. Obrigada por sempre ser receptiva, por orientar e aconselhar pensando sempre no melhor. Por me receber tão bem junto à sua família. Obrigada por confiar em mim. Estarei sempre disponível*

*Aos amigos que fiz na pós-graduação e a todos colegas da **CTBMF/FOA** por*

*partilharem momentos, festividades, suporte e responsabilidades. Em especial: **Pedro Chaves, Izabella Sol, Paulo Matheus, Melissa Murai, Luiz Guilherme Fiorin, Harisson Valeriano, Barbara Rios, Anderson Santos, Laís Kawamata, Beethoven Costa** e a todos os alunos do grupo do **Prof. Francisley** e da **Prof. Roberta** que trabalham juntos conosco e fazem com que os projetos sejam cada vez melhores, muito obrigada por tudo. A jornada da pós-graduação não seria a mesma sem a presença calorosa e inspiradora de vocês. Obrigada por tornarem os dias mais leves, por compartilharem conhecimentos, desafios e risadas. Cada um de vocês trouxe uma peça única para esse quebra-cabeça acadêmico, tornando nossa experiência coletiva mais rica e significativa.*

*A **Maria Eduarda Freitas e Luana Oliveira**, minha profunda gratidão por cada uma de vocês. Ao longo dos anos, nossa amizade tem sido uma fonte constante de apoio, alegria e conforto, apesar das nossas diferenças, nós sabemos de onde viemos e como chegamos fazendo com que o caminho fosse sempre lembrado e também sempre consagrado. Obrigado por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, por compartilharem risos, lágrimas e as muitas aventuras da vida. Nós sabemos!*

*Ao **Giovanni Saci** e ao **Pedro Chaves**, quero dedicar algumas palavras para expressar minha sincera gratidão por ter cruzado os caminhos de vocês. Conhecer amigos de maneira inesperada foi uma agradável surpresa na minha vida. Obrigada por trazerem alegria, diversidade e novas perspectivas para o meu mundo. Vocês são um presente valioso que enriquece a minha jornada de maneiras que eu não poderia ter previsto. Agradeço por compartilhar risadas, experiências e por fazer parte integrante da minha rede de apoio. As presenças de vocês tornaram minha vida mais rica e colorida.*

Aos meus amigos da vida, Caio Megiani, Isabela Parrete, Thaina Castilheri, Luan Santos, Jessinando, Família Xavier, Maria Eduarda Bifaroni, Matheus Silva, Wassila Borges, Yukio Yokota, Rafael Rovina, Os Parras, Marcel Lima, Marília Rodrigues, Rosane Rachas, Mariana Bandeira, Monara Bornelli, Ana Caroline Lima, Luiz Otávio Rovina, Leandro Mendonça, Yan Brenner, Samêla Rezende, Pedro Ribeiro, Letícia Manfrinato, Carla Sanches, Rafaela Jacomassi, Natalia Lucatto, Sávio Alves, Renan Lemos, Vitória Parmejane, Paulo Sales, Cáira Medeiros, Mayara Mendonça, minha profunda gratidão por cada um de vocês. Ter amigos verdadeiros é uma dádiva rara e valiosa que enriquece minha vida de maneiras incontáveis. Obrigado por serem alicerces sólidos nos momentos difíceis, por compartilharem alegrias nas conquistas e por estarem presentes em cada capítulo da minha jornada. Agradeço pelo apoio incondicional e por serem verdadeiros companheiros. Vocês são mais do que amigos; são uma parte essencial da minha vida e da minha história.

*A **minha Ala**, não posso deixar dedicar um momento para expressar minha profunda gratidão por cada um de vocês. A presença de amigos verdadeiros em minha vida é um presente inestimável que enriquece meus dias de maneiras indescritíveis. Obrigada por serem autênticos, por compartilharem suas vidas, sonhos e desafios de uma maneira que vai além da superficialidade. Nossa honestidade e lealdade são pilares que sustentam nossa amizade, e eu valorizo cada instante que passamos juntos. Agradeço por estarem ao meu lado nas alegrias e nas tristezas, por serem meu porto seguro nos momentos difíceis e por celebrarem comigo nas vitórias. Profundamente grata por ter amigos tão preciosos como vocês em minha jornada.*

Agradecimientos

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP e seus representantes, senhor diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do senhor, vice-diretor Prof. Ass. Luciano Tavares Angelo Cintra, do senhor Prof. Tit. Wirley Gonçalves Assunção, como coordenador do programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de ser aluna desta tão renomada instituição, onde cada um que faz parte tem consciência e faz jus ao legado que carrega.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador Professor Dr. Wirley Gonçalves Assunção.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP) pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas do mestrado, em especial as Servidoras Cristiane Regina Lui Matos e Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto. Agradeço o trabalho sempre eficiente por vocês desempenhado.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP) pela prontidão em nos atender.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa BCO Processo nº 2022/06429-8 - Treinamento Técnico TT3, que é vinculada ao Auxílio à Pesquisa do Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, a qual foi fundamental para

realização desta e demais pesquisas.

Aos demais professores do Departamento de Cirurgia, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dra. Alessandra Aranega, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Ana Paula Bassi, Prof. Dr. Leonardo Faverani. Obrigada por partilharem de todo conhecimento e acolhimento a todo o momento.

Aos funcionários do NEC ODONTO, em especial, Elisa. Aos funcionários do INSPE ODONTOLOGIA, Rose, Daniela, Carol e Samêla. Ao IRG CONCEITO, Franciane as meninas Dayse, Camila, Héliide, obrigada por todo auxílio, amizade e paciência. Vocês são muito importantes para que tudo aconteça, e que para que todos os dias aqui não saia do trilho. Obrigada, obrigada, obrigada.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia de Araçatuba, coordenado pela Professora Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira e em especial seu orientado, Eduardo que sempre esteve conosco em dias de laboratório.

Ao Laboratório de Multiusuário - Sala de Microtomografia Computadorizada na pessoa do Professor Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP) em nome da Técnica Sônia Zanetti e ao laboratório de Físico/Química.

Ao **Laboratório de Endodontia**, coordenado pelo Professor Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra por permitir a utilização do Microscópio Polarizado para análise de birrefringência, e a seu aluno de Doutorado Fábio e Pedro pela orientação e assistência.

Ao **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, e ao grande Seu **João Batista**, responsável pelo suporte, apoio e amizade no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos **funcionários da FOA/UNESP, Marco, Paulo, Renato, Fausto, Celinha** obrigada por nos aconselhar e nos encaminhar durante todo este processo. As demais sessões da pós-graduação, esterilização, limpeza, entre outras, e seus servidores que sempre prestaram um atendimento importante.

Aos **funcionários da Santa Casa de Araçatuba, Unimed Araçatuba e Unimed Birigui**, pelo respeito e educação que sempre mantiveram com a nossa equipe.

Aos **pacientes**, por de toda e qualquer forma mudarem meu modo de ver a vida, agradeço a confiança e oportunidade de aprender e evoluir com cada um de vocês.

Aos **animais**, in memoriam, que sacrificaram suas vidas em prol da ciência.

Epigrafe

"Que possamos semear o bem por onde formos, compreendendo que cada gesto de amor é uma luz que ilumina os caminhos da alma."

Autor: Joanna de Ângelis (psicografado por Divaldo Franco)

MARCHIOLLI, C. L. **Estudo da resposta biológica de uma superfície de titânio revestida com odanacatib: análise de molhabilidade e biocompatibilidade.**

Estudo in vitro e in vivo. 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

Estudos recentes e prospectivos tem relacionado o sucesso da osseointegração as características das superfícies de implantes de titânio, abrindo campo para os tratamentos de superfície, associados ou não a princípios químicos com o propósito de otimizar a osseointegração e aumentar a neoformação óssea, visando aprimorar e inovar as metodologias. Com isso, tem-se que o objetivo deste trabalho é avaliar a dinâmica da resposta biológica de uma superfície modificada por duplo ataque ácido, modificado por ácido mais Solução de Fluidos Corpóreos (SBF) e modificada pelo princípio ativo Odanacatib, na concentração de 0,26mg/ml, pelo método biomimético em modelo subcutâneo padronizado em ratos machos e análise de cultura de células. Após a análise de topografia, de rugosidade de superfície e molhabilidade, serão destinados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) para a realização da análise de biocompatibilidade (subcutânea) e serão utilizados 78 discos de titânio de 0,5 cm de diâmetro e 0,2 cm de altura, sendo 16 com superfície de duplo ataque ácido (GCS), 16 com superfície modificada por SBF (GXS) e 16 com superfície modificada a base de Odanacatib (GOS) pelo método biomimético de modificação de superfície, em que serão instalados 2 discos por animal no tecido subcutâneo nas regiões extremas do dorso do animal contralateralmente, em que a coleta das amostras de tecido subcutâneo serão 7 e 15 dias. De acordo com a hipótese proposta, os resultados foram esclarecedores para entender o comportamento das superfícies testadas, atribuindo uma visão mais precisa diante do comportamento biológico, quando em íntimo contato com o tecido conjuntivo. Em que foi possível avaliar que a ação tópica do ODN no tecido conjuntivo não resulta em efeitos adversos. Conferindo resultados otimizados nas análises de topografia e ângulo de contato em relação aos demais grupos experimentais, e resultados semelhantes a superfície biomimética na análise de biocompatibilidade aos 7 e aos 15 dias.

Palavras-chave: Osseointegração. Titâneo. Catepsina K.

MARCHIOLLI, C. L. **Study of the biological response of a titanium surface coated with odanacatib: analysis of wettability and biocompatibility. In vitro and in vivo study.** 2024. Dissertation (Master's Degree) - School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Recent and prospective studies have linked the success of osseointegration to the characteristics of the surfaces of titanium implants, opening up the field for surface treatments, associated or not with chemical principles with the aim of optimizing osseointegration and increasing bone neoformation. The aim is to improve and innovate methodologies. With this in mind, the aim of this study is to evaluate the dynamics of the biological response of a surface modified by double acid attack, modified by acid plus Body Fluid Solution (SBF) and modified by the active ingredient Odanacatib, at a concentration of 0.26mg/ml, using the biomimetic method in a standardized subcutaneous model in male rats and cell culture analysis. After analyzing the topography, surface roughness and wettability, 24 rats (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) will be used for the biocompatibility analysis (subcutaneous) and 78 titanium discs of 0.5 cm in diameter and 0.2 cm in height will be used, 16 with a double acid etched surface (GCS), 16 with an SBF-modified surface (GXS) and 16 with an Odanacatib-modified surface (GOS) using the biomimetic surface modification method, in which 2 disks per animal will be installed in the subcutaneous tissue in the extreme regions of the animal's back contralaterally, subcutaneous tissue samples were taken at 7 and 15 days. According to the proposed hypothesis, the results were enlightening in terms of understanding the behavior of the surfaces tested, providing a more accurate view of biological behavior when in close contact with connective tissue. It was possible to assess that the topical action of ODN on connective tissue does not result in adverse effects. The results were optimized in the topography and contact angle analyses compared to the other experimental groups, and the results were similar to the biomimetic surface in the biocompatibility analysis at 7 and 15 days.

Keywords: Osseointegration. Titanium. Cathepsin K..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - 1ª Fase de modificação por ácido dos GCS, GXS e GOS	17
Figura 2 – Discos imersos na solução de NaOH	18
Figura 3 - Preparação do simulador de fluído corpóreo	18
Figura 4 – Solução de fluído corpóreo com Odanacatib	19
Figura 5 – Discos imersos em SBF e SBF com Odanacatib	19
Figura 6 – Etapa final do tratamento de superfície dos grupos GXS e GOS	20
Figura 7: Delineamento Experimental referentes à cirurgia para a instalação dos discos	21
Figura 8 - Delineamento experimental referente à análise subcutânea	22
Figura 9 – Procedimento cirúrgico da implantação dos discos de titânio de acordo com os modelos pré-estipulados	23
Figura 10 – Análise de molhabilidade para obtenção do ângulo de contato	26
Figura 11 - Ferramenta Grid no software ImageJ com traçado de grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica obtida em aumentativa de 100x	
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo Controle: GCS	30
Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo SBF (GXS):	31
Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo Odanacatib (GOS):	31
Figura 15 – Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GCS	32
Figura 16 – Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GXS	32
Figura 17 – Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X do GOS	32
Figura 18 – Obtenção do ângulo de contato	33
Figura 19 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo Controle 7 e 15 dias.	35
Figura 20 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo SBF 7 e 15 dias	35
Figura 21 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo SBF 7 e 15 dias	36
Figura 22: Imagens representativas da coloração do Picrosirius red para identificar a maturidade das fibras colágenas	38
Figura 23: Análise de Imunoistoquímica (Interleucina 6) em 40x	39
Figura 24: Análise de Imunoistoquímica (VEGF) em 40x	40
Figura 25: Análise de Imunoistoquímica (TGF B) em 40x	40
Figura 26: Análise de Imunoistoquímica (COL1) em 40x	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise de molhabilidade	31
Gráfico 2 - Histomorfométrico	37
Gráfico 3 – Quantificação das fibras colágenas através da análise de picrosiriusred	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise estatística da avaliação do ângulo de contato	34
Tabela 2 – Análise histomorfométrica (Vasos Sanguíneos)	37
Tabela 3 – Análise histomorfométrica (Linfócitos)	37
Tabela 4 – Análise Imunomarcação	41

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Tratamento dos Implantes e Discos	17
3.1.1 Preparação da Superfície Teste e Controle	17
3.2 Delineamento Experimental	20
3.3 Procedimento Cirúrgico	22
4 ANÁLISES PROPOSTAS	25
4.1 Análise de topográfica (Microscopia Eletrônica de Varredura e Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X)	25
4.2 Análise de molhabilidade	25
4.3 Análise Histológica	26
4.4 Análise Histomorfométrica qualitativa e quantitativa em subcutâneo (Análise de Biocompatibilidade)	26
4.5 Análise da maturação de fibras colágenas (picrosírus red)	28
4.6 Análise de Imunoistoquímica	28
4.7 Análise Estatística	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação com implantes dentários tem ganhado cada vez mais destaque a permitir a restauração estético-funcional do sistema estomatognático através de propriedades mecânicas adequadas, estabilidade oclusal e osseointegração (CRUZ, M.B, 2022 e SANTOS, A.F.P 2023). A osseointegração é um processo que segue a sequência conservada de regeneração óssea e é fundamental para o sucesso clínico dessas reabilitações (YOUNIS et al., 2010 e MAZZO et al., 2012). Tendo a topografia e as propriedades químicas da superfície do implante dentário como fator determinante da velocidade e a qualidade da neoformação óssea.

Os pesquisadores apontam que as superfícies rugosas aumentam a área de contato na interface osso-implante, a adesão dos osteoblastos e facilitam a adsorção seletiva de proteínas, o que favorece a osseointegração. Com o intuito de otimizar estas superfícies, os estudos de superfícies bioativas, conduzem o aprimoramento da incorporação de princípios ativos de ação osteocondutora, estimulando a osteogênese e a fixação osso-implante. (CRUZ, M.B 2022 e LOTINUN S, 2013).

Dentre os princípios ativos disponíveis na indústria e na literatura, cabe-se introduzir o Odanacatib (ODN), um inibidor altamente seletivo e sensível da cathepsina K (CTSK), que por sua vez, é a principal enzima que impulsiona a reabsorção durante a reconstrução óssea. Em outras palavras, o ODN atua na inibição da reabsorção óssea sem afetar a formação óssea, além de aumentar a densidade mineral óssea (DMO). No entanto, o ODN foi interrompido no estudo de fase III do Long-term Odanacatib Fracture Trial (LOFT), devido ao potencial risco de acidente vascular cerebral (AVC).

Estudos revelam que o ODN apresenta vantagens em relação a ação dos bisfosfonatos, pois reduz a eficiência de reabsorção das células, mas não altera as outras funções osteoclásticas normais, como diferenciação, migração e polarização (DUONG, 2012; MUISE *et al.*, 2016). Por não ocorrer a morte dos osteoclastos, visto que os sinais entre as células osteoblasticas e osteoclasticas podem continuar de forma inalterada, conclui-se que o efeito reproduzido pelos CTSK é substancial na formação óssea e na inibição da reabsorção, por atuar de forma exclusiva nos osteoclastos.

Outros estudos realizado em macacos ovariectomizados, tratados com duas

concentrações de CTsK, concluíram que os grupos tratados com a maior concentração apresentaram melhores resultados em relação aumento a densidade mineral óssea, suprimindo a reabsorção óssea, não afetando o número de osteoclastos pelos biomarcadores de osteoclastos-fosfatase ácida resistente ao tratarato 5b (TRAP-5b), de colágeno-1 e fosfatase alcalina específica do osso (BSAP) e melhores resultados histológicos em relação aos grupos SHAM e OVX (FRATZL-ZELMAN *et al.*, 2013). Além de apresentar um aumento significativo na resistência óssea medida pela carga final com tratamento com odanacatib. (CUSICK *et al.*, 2012).

Em uma revisão e meta-análise de estudos clínicos randomizados e controlados por placebo publicados em 2023, mostraram que o ODN aumentou significativamente a DMO e reduziu em 48,31% as concentrações de telopeptídeos C séricos de colágeno tipo I (sCTX) e em 56,54%, N-telopeptídeo/creatinina urinária (uNTx/Cr) em pacientes com osteoporose, em comparação com grupo controle placebo. Em termo de formação óssea, pacientes em tratamento contínuo com ODN apresentaram aumento do pró-peptídeo N-terminal, marcador de formação óssea tipo I (P1NP). (ROGNJIN *et al.*, 2023).

Na literatura, há registro de efeitos adversos (EAs), de forma geral em relação aos CTsK, e um dos efeitos adversos são as reações cutâneas semelhantes à morfeia, também designada: esclerodermia localizada (EsL), que é uma doença do tecido conjuntivo de etiologia desconhecida, na qual o excesso de deposição de colágeno leva ao desenvolvimento de lesões escleróticas (SILVA; SILVA; MORGADO, 2018), além de preocupações em relação a infecções respiratórias graves observadas em ensaios anteriores com balicatib (outro inibidor da catepsina K). No entanto, esses efeitos foram monitorados cuidadosamente em ensaios de ODN, que por ser um inibidor da protease K mais seletivo que o balicatib, apresentava um risco semelhante de EAs cutâneos ao placebo. (BONE *et al.*, 2010; PERONI *et al.*, 2008).

Contudo, apesar das descobertas promissoras, mais estudos são necessários para mapear o efeito do ODN de forma sistêmica e explorar o seu efeito tópico. Dado isso, presente estudo visa avaliar a dinâmica da resposta biológica de uma superfície de titânio modificada por Odanacatib pelo método biomimético e tratada por duplo ataque ácido e com solução de fluido corpóreo em modelo subcutâneo padronizado em ratos machos para mapeamento do condicionamento celular do perfil inflamatório

e possíveis efeitos colaterais dose-dependente.

Uma vez que a literatura carece de estudos de caracterização de superfícies associado ao Odanacatib, o atual estudo propõe introduzir as propriedades topográficas, perfil físico-químico e comportamento biológico no que diz respeito a osseointegração. Visando alternativas reabilitadoras para beneficiar pacientes que apresentem alteração no metabolismo ósseo, como é o exemplo da osteoporose, e em casos em que a quantidade e a qualidade óssea são deficientes (MC-CLUNG *et al.*, 2014; MERCK, 2014).

2 OBJETIVOS

O estudo atual propôs avaliar a resposta biológica de uma superfície de titânio comercialmente puro modificada por duplo ataque ácido, por SBF e pelo princípio ativo Odanacatib na concentração de 0,26mg/ml (miligrama por mililitro), por meio do método biomimético em modelo padronizado em subcutâneo de rato macho através das análises topográfica, molhabilidade e de biocompatibilidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tratamento dos Discos

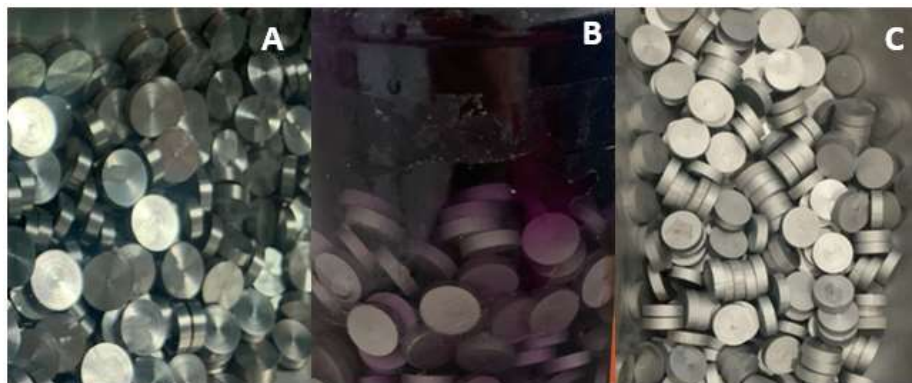
3.1.1 Preparação da Superfície Teste e Controle

1ª Fase: Modificação por ácido:

Nesta fase, a superfície dos 76 discos de titânio comercialmente puros sofreram uma subtração ácida por meio de banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico, o qual provoca erosões na superfície (Figura 1A, B e C). A concentração dos ácidos, o tempo e a temperatura são fatores determinantes da microestrutura da superfície. Em que, as concentrações e tempo de exposição dos ácidos empregados constituem o segredo de indústria, previamente patenteado.

Os discos foram marcados em sua periferia com auxílio de uma broca diamantada para o controle do tratamento de sua superfície foram posicionados de forma que a mesma superfície se mantivessem o contato com as soluções durante o tratamento.

Figura 1 - 1ª Fase de modificação por ácido dos GCS, GXS e GOS



Modificação por subtração ácida em banhos:

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

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

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

Nesta outra fase, os discos de titânio tiveram sua superfície modificada por SBF e Odanacatib segundo o método biomimético de modificação de superfície, que

imita o processo biológico de formação de tecido duro em corpo (ABE; KOKUBO; YAMAMURO, 1990; APARECIDA *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2013) em dois ciclos. Os discos foram imersos em 50 mililitros (ml) de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) e 5,0 Mol Litro (Mol.L-1) e colocados em estufa por um período de 24 horas a 60 graus célsius (°C), para a ativação da superfície (Figura 2). Em que os mesmos foram mantidos, posteriormente, em estufa por um período de 3 horas a 60°C para secagem da superfície.

Figura 2 – Discos imersos na solução de NaOH

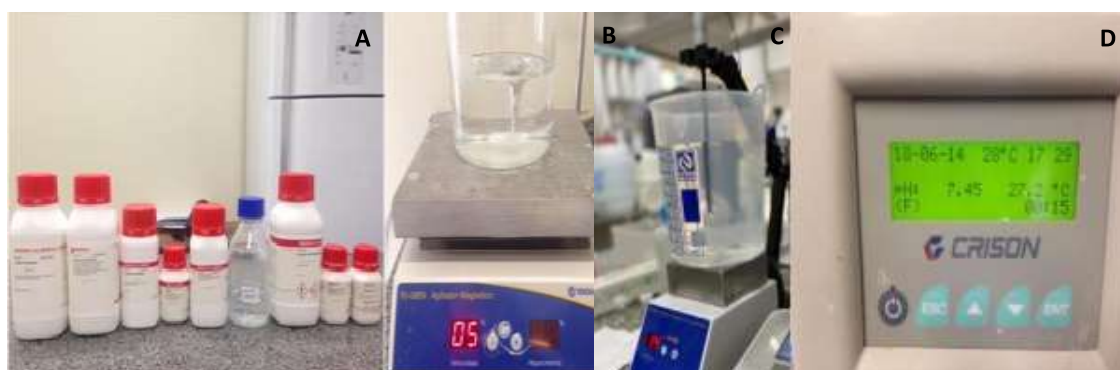


A) Discos em posição imersos pela solução de NaOH

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

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

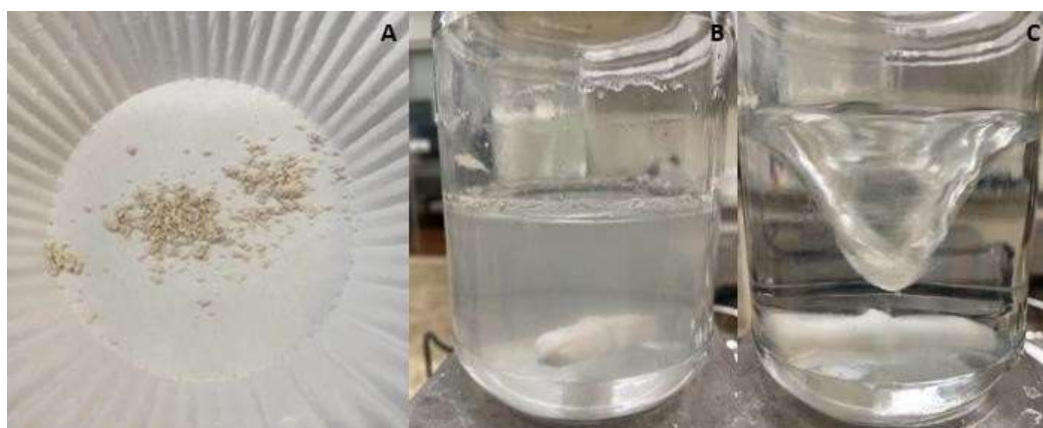
Figura 3 - Preparação do simulador de fluido corpóreo



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

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 4 – Solução de fluido corpóreo com Odanacatib

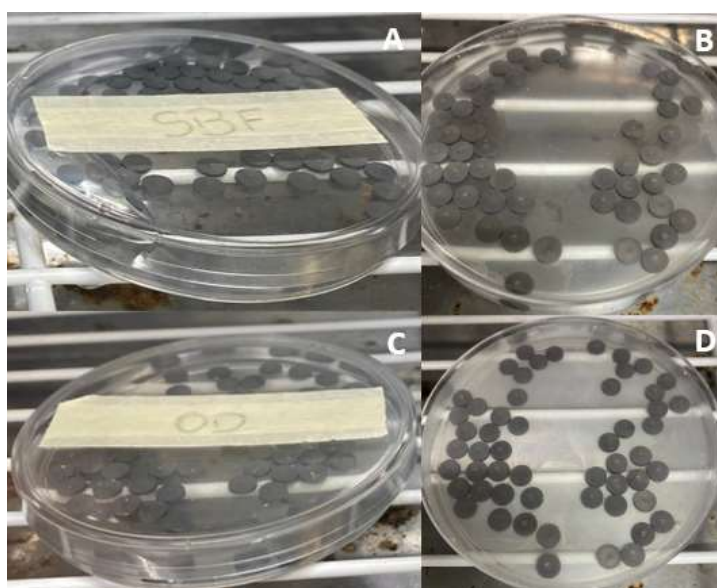


- A) Pesagem do composto Odanacatib na proporção de 0,26mg/L;
 B) Recipiente de vidro com SBF e Odanacatib a 0,26mg/L; e
 C) Homogeneização da SBF com Odanacatib por meio do agitador orbitário.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

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

Figura 5 – Discos imersos em SBF e SBF com Odanacatib

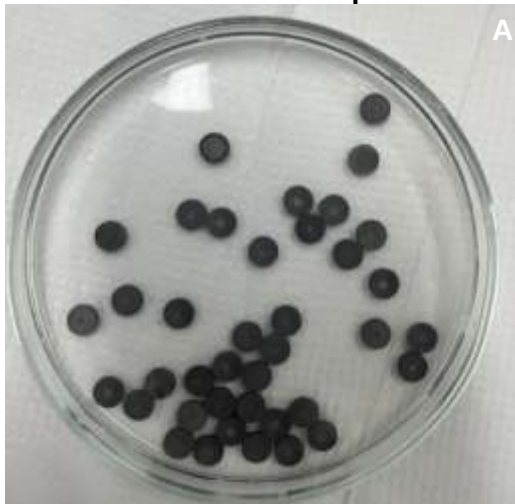


- A) Discos submersos em SBF em uma placa de petri identificada;
 B) Discos submersos em SBF;
 C) Discos submersos em SBF com Odanacatib 0,26mg/ml em uma placa de petri identificada;
 D) Discos submersos em SBF com Odanacatib 0,26mg/ml.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

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

Figura 6 –Etapa final do tratamento de superfície dos grupos GXS e GOS



A) Vista no banho de solução de Peróxido de Hidrogênio de volume 10;

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

3.2 Delineamento Experimental

No presente estudo foram utilizados 48 ratos Wistar machos (*Rattusnovergicus albinus* Wistar), com base no cálculo amostral realizado no site http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/ta_diferenca_media_independente.php e para a análise subcutânea também foi realizado um cálculo comparativo baseado no estudo subcutâneo realizado por Cintra L.T.A, Ervolino E. e Gomes-Filho J.E em 2015 denominado: “Biocompatibilidade e capacidade de mineralização dos cimentos experimentais Sealepox e Sealepox RP comparativamente ao Pro-Root MT: estudo histológico e imunoistoquímico em tecido subcutâneo de ratos”, obtendo o valor de 24 ratos Wistar machos (*Rattus novergicus albinus* Wistar) onde em cada espécime foi instalado dois discos em região de dorso, e para a definição do número da amostra (superfícies por grupo), inicialmente foi realizado o cálculo do poder do Teste (“Power Test”), em que para a obtenção de um poder de 0.95 com nível de significância de 5%, diante dos grupos amostrais, o número mínimo de amostras sugerido por grupo

foi de 8.

O projeto seguiu os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), que foi protocolado sob nº 0524-2021 (Anexo A).

Com isso, foi realizado o delineamento experimental partindo de duas análises in vitro de topografia e molhabilidade e in vivo a partir da amostra de 24 animais subdividido em 3 grupos experimentais para a realização das análises de histologia e histométrica. (Figura 7 e 8).

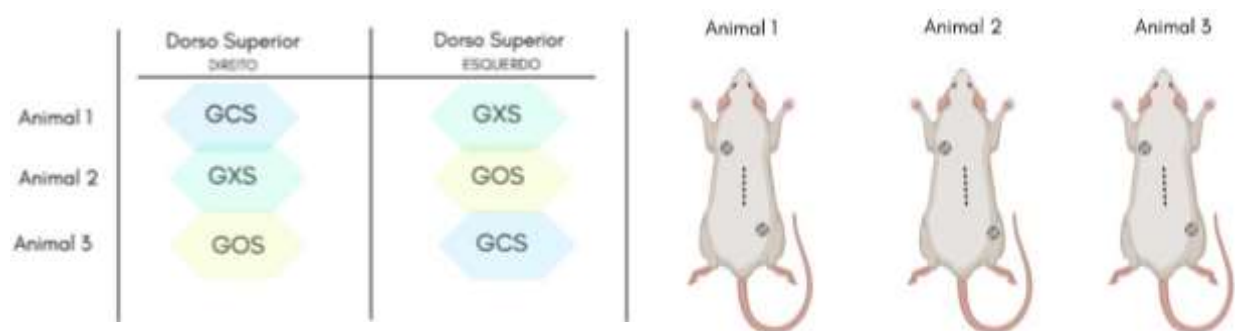
Grupos experimentais:

Grupo Controle (GCS): disco de superfície de duplo ataque ácido foi instalado no dorso do animal;

Grupo modificado por SBF (GXS): disco de titânio com superfície modificada a base de SBF foi instalado no dorso do animal;

Grupo modificado por Odanacatib (GOS): disco de titânio com superfície modificada a base de Odanacatib foi instalado no dorso do animal;

Figura 7: Delineamento Experimental referentes à cirurgia para a instalação dos discos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 8 - Delineamento experimental referente à análise subcutânea (discos)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Os animais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 24^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico.

3.3 Procedimento Cirúrgico

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 12 horas. A anestesia por sedação foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 60 mg/Kg, e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 8 mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica à infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg no dorso do animal. (Figura 9 A)

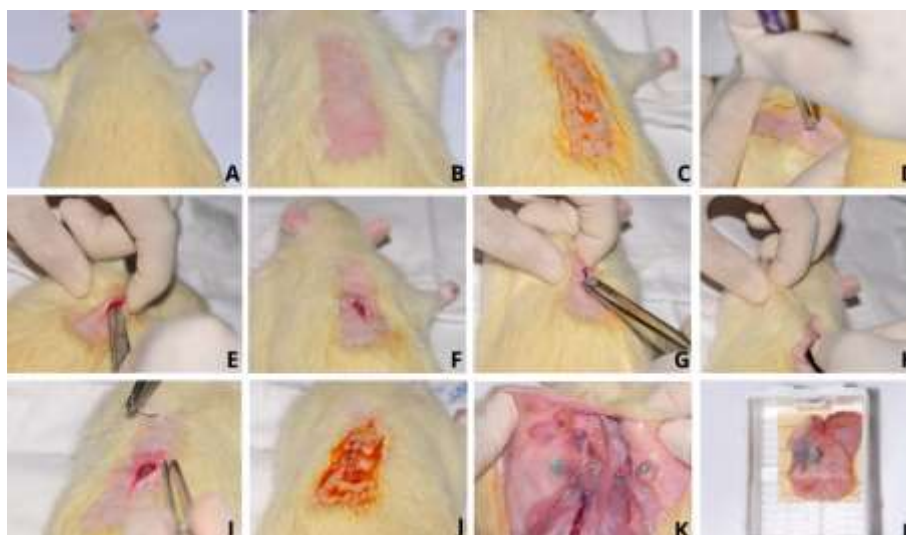
Após prévia tricotomia da região dorsal e antissepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo

ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), foi realizada incisão de 2 cm no dorso do animal, em uma orientação craniocaudal, com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German) (Figura 9 B,C e D).

O plano cutâneo foi divulsionado de forma bilateral à incisão, para que se formem “bolsos” entre pele e tecido subcutâneo. Em cada animal foi inserido 2 discos de titânio (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) tratados no total, permutando entre os grupos GCS, GXS e GOS, inseridos cada um de um lado da incisão, de forma aleatória. Finalizada a inserção subcutânea do implante, o retalho cirúrgico foi reposicionado e o plano cutâneo suturado por pontos interrompidos simples com fio de nylon 4-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos (Figura 9 H, F,G, H, F, G, H, I e J)

As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica. No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e três doses de morfina (Dimorf®, Itapira, São Paulo, Brasil), com intervalo de 24 horas entre elas, na concentração de 2,5mg/kg.

Figura 9 – Procedimento cirurgico da implantação dos discos de titânio de acordo com os modelos pré-estipulados.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2024)

- A) Espécime após anestesia;
- B) Após tricomotomia;
- C) Após antisepsia;
- D) Incisão linear em dorso sentido crânio-caudal;
- E) Instalação dos discos no subcutâneo;
- F) Demonstrativo da incisão;
- G) Instalação dos discos no subcutâneo;
- I) Sutura com Vycril 4-0
- J) Antisepsia após sutura
- K) Discos em posição na eutanásia de 15 dias
- L) Peça coletada.

3.4 Coleta das amostras

As eutanásias dos 24 animais foram realizadas nos períodos de 7 e 15 dias para a análise do processamento subcutâneo, por dose excessiva de anestésico Tiopental (150mg/kg, Thiopentax, Itapira, São Paulo, Brasil) adicionado a lidocaína (4mg/kg, Xylestesin®, Itapira, São Paulo, Brasil), para a remoção foi respeitada a margem de 1 centímetro da borda do disco de titâneo. As peças cirúrgicas foram fixadas por 48 horas em formol (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) neutro a 10% tamponado.

4. ANÁLISES

4.1 Análise de topográfica (Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X)

Após a esterilização a raio gama os 6 discos foram metalizados com recobrimento de carbono, para tornar a superfície sensível a condução de elétrons e permitir a leitura pela microscopia eletrônica de varredura (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) com finalidade de avaliar a morfologia da superfície por meio do contraste do revelo, e para avaliar e a composição química e formação da película de óxido, onde foi realizada a Espectroscopia de energia dispersiva de raio x, que permite o contraste em função do número atômico dos elementos presente.

Esta análise foi realizada em pela Faculdade de Odontologia de Araraquara.

4.2 Análise de molhabilidade

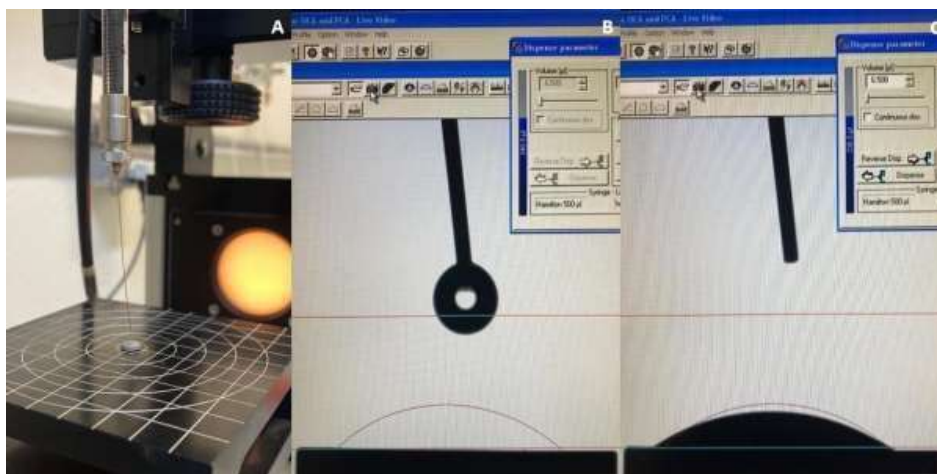
Oito discos de cada grupo experimental foram analisados quanto à interação de contato se superfície pré-instalação subcutânea, pelo método da gota séssil, utilizando como soluções testes: Água destilada e Solução de fluido corpóreo.

A medida do ângulo de contato foi feita com auxílio do goniômetro (DSA 100- Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha), que capturou a gota séssil das soluções nas superfícies, em que o parâmetro adotado para o dispense foi: volume 6.500 μ l (microlitros), taxa de 5.00 em 4 segundos após o conato.

Os cálculos e demais dados foram gerados pelo software (DSA4 - Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) e pelo registro fotográfico, em que foi fornecido o valor do ângulo de contato (θ) das diferentes superfícies para cada solução experimental. A mensuração de cada amostra foi repetida 3 vezes para obtenção do valor médio do ângulo de contato (θ) das diferentes superfícies. Os dados quantitativos foram tabulados e posteriormente foram levados a análise estatística.

Para a classificação das características de tensão de superfície, partindo do princípio de que um baixo ângulo de contato com um ângulo inferior a 90° é hidrofílico, próximo ou igual a 0° é considerado superhidrofílico, quando for maior que 100° é hidrofóbico, e ao exceder 150° é classificado como superhidrofóbico (DAPPER, S. T. H em 2013). (Figura 10 A, B e C).

Figura 10 – Análise de molhabilidade para obtenção do ângulo de contato



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

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

4.3 Análise Histológica

Processamento para Inclusão em Parafina – Subcutâneo

Após a eutanásia de 24 animais para o estudo subcutâneo e obtenção das amostras dos grupos: GCS, GXS e GOS, estas foram mantidas por um período de 48 horas de fixação em formol. Em seguida, essas 48 amostras de tecido subcutâneo contendo os discos foram lavandas em água corrente por 12 horas e desidratadas utilizando uma sequência de álcoois 70, 80, 90, 95, 100I, 100II, 100III e álcool/xilol (1:1) com trocas de hora em hora. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada 45 minutos para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 μ m de espessura e montados em lâminas.

As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE), para as reações de imunoistoquímica e picrosirius red. Previamente à realização das análises histomorfométrica, picro sirius red e imunoistoquímica, as amostras foram codificadas de maneira que somente um avaliador conhecia quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

4.4 Análise Histomorfométrica qualitativa e quantitativa em subcutâneo

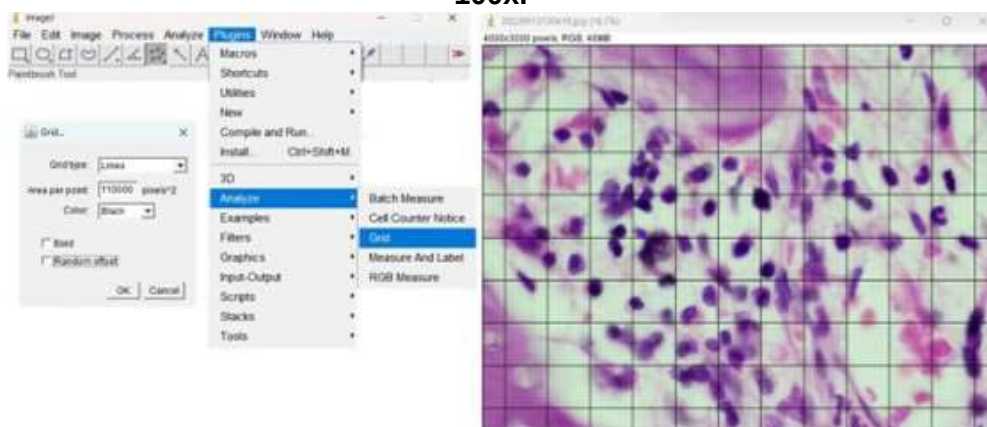
(Análise de Biocompatibilidade)

A análise de biocompatibilidade foi realizada após ser estabelecidos critérios quantitativos para avaliar a reação inflamatória e formação de tecido fibrocelular. As imagens das lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carl Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado a um computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7®) e Software para processamento e análise de imagens 37 (AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates Ltd, Jena, Deutschland).

As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem estudadas. A análise histomorfométrica foi realizada com as imagens obtidas com objetiva de 100x com auxílio de óleo de imersão. Para comparar as diferenças estruturais entre as seções dos discos aumentados, cada biópsia foi dividida em três áreas. A primeira área (A1) bordo superior, segunda área (A2) bordo lateral direita, a terceira área (A3) bordo lateral esquerda da região onde se encontrava em íntimo contato com o disco.

As áreas foram mensuradas por meio da grade de Merz. Utilizando quatro grades retangulares com 130 pontos/grade sobre as imagens, para quantificação das células linfocitárias e vasos sanguíneos. O cálculo da porcentagem de cada item analisado foi alcançado quantificando a presença de cada tipo de tecido em cada ponto da grade. O total de pontos das áreas (A1, A2 e A3) de cada tipo de tecido foram somados e dividido por 4, obtendo dessa forma uma média da porcentagem tecidual relativa de cada item de todas as amostras. (Figura 11).

Figura 11 - Ferramenta Grid no software ImageJ com traçado de grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica obtida em aumentativa de 100x.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

4.5 Análise da maturação de fibras colágenas (picrosírus red)

Os cortes corados com Picrosirius Red foram analisados sob microscopia com luz polarizada com objetivo de identificar a maturação das fibras colágenas maduras e imaturas nas áreas padronizadas do tecido subcutâneo (A1, A2 e A3) (Terayama et al., 2020; Cintra et al., 2017).

Foi realizada a seleção de cor, considerando as fibras amarelas-esverdeadas como imaturas e finas, enquanto as vermelhas-amareladas foram consideradas como maduras e grossas. Posteriormente com o auxílio do software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch — Germany) foi utilizado para o cálculo da área demarcada com cada tipo de fibra colágena, tabulação dos dados e análise estatística (Cintra et al., 2017).

4.6 Análise de Imunoistoquímica

A análise das peças subcutâneas foram utilizados os anticorpos primários Interleucina 6 (IL-6) (Goat anti-IL-6 SC28343 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América); colágeno 1 (COL-1) (Goat anti-COL-I SC59772 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América), o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) (Goat anti-TGF- β SC 130348– Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Goat anti-VEGF-SC 130348– Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

O anticorpo secundário biotilado foi o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin-SP-AffiniPure, donkey anti-goat imunoglobulina E 705065147– Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) bem como a expressão das proteínas, COL-1, IL-6, TGF- β e VEGF, acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com

um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça).

Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos (Quadro 2). O avaliador desconheceu o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise.

Quadro 1 - Escores e frequência de porcentagem para análise de imunoistoquímica

Quantidade de Marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de Marcação	-	0%
Marcação Positiva	+	20% (Entre 10% a 30%)
Marcação Superpositiva	++	60% (Entre 50% a 70%)
Marcação Hiperpositiva	+++	90% (Entre 80% a 100%)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

4.5 Análise Estatística

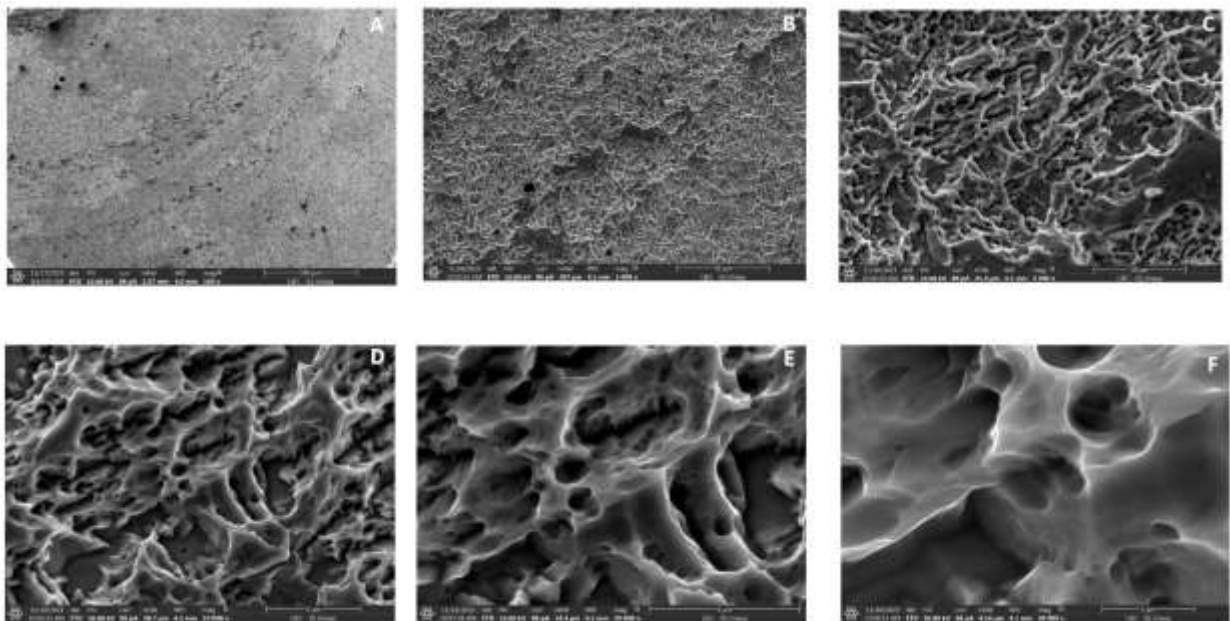
A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. Os testes foram conduzidos através de software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América), os valores tabelados das análises de: Histomorfométricas (HE) e Picrosirius Red foram submetidos a um teste de normalidade para avaliação da distribuição das amostras (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Após a confirmação da distribuição normal das amostras, teste ANOVA 1-fatores ANOVA 2-fatores e o pós- teste de Tukey para adotando nível de relevância de ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Topográfica

Na análise de MEV foi observado uma topografia com comportamento subtrativo oriundo do tratamento de subtração ácida no GCS, levando à formação de microcavidades de tamanhos e profundidades variadas em todos os grupos com diferentes perfis. (Figura 12,13,14). No grupo GXS foi possível observar uma rugosidade homogeneia e com a formação de cristais de hidroxiapatita (HA) resultando em um aspecto de teia de aranha. No grupo GOS foi possível notar uma superfície rugosa, homogênia, com aspecto globular e com presença de partículas de HA em menor quantidade (Figura 13 e 14).

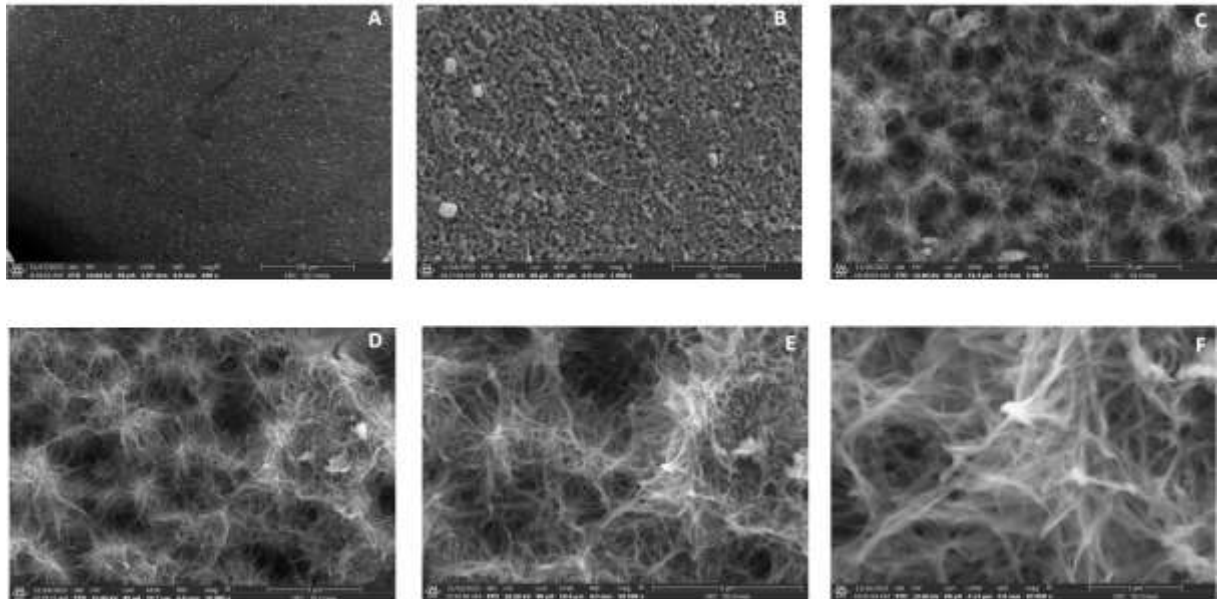
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo Controle: GCS



Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2024)

- A) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 100x;
- B) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 1.000x;
- C) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 5.000x;
- D) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 10.000x;
- E) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 20.000x;
- F) Superfície modificada por duplo ataque ácido (GCS), em aumento de 50.000x;

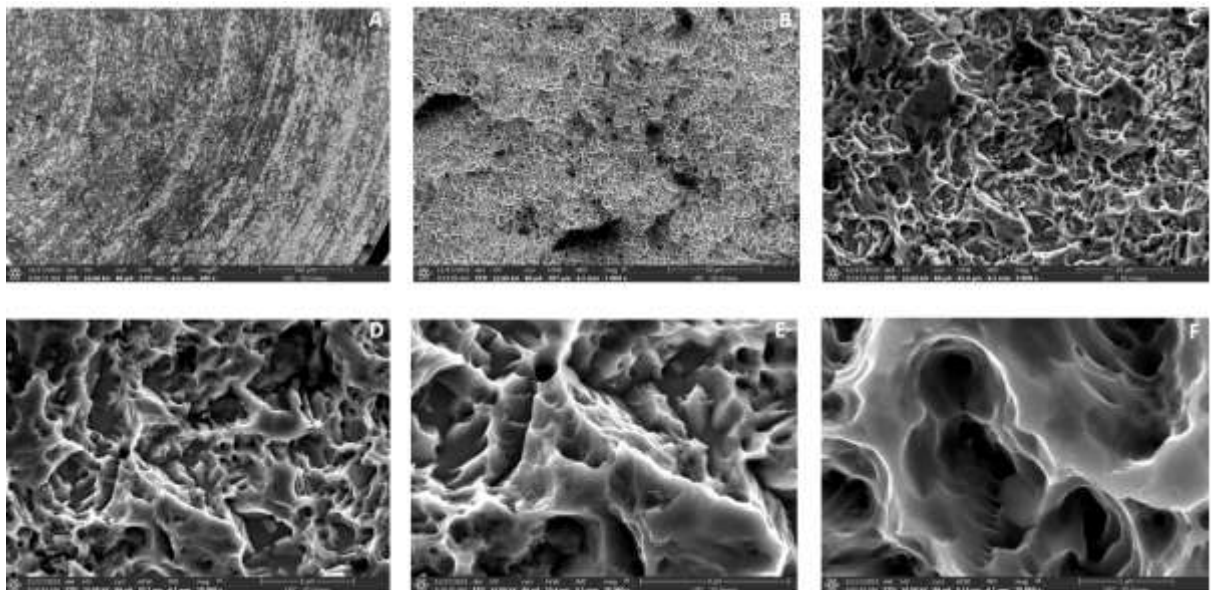
Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo SBF (GXS):



Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2024)

- A) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 100x;
- B) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 1.000x;
- C) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 5.000x;
- D) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 10.000x;
- E) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 20.000x;
- F) Superfície revestida por SBF (GXS), em aumento de 50.000x;

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies experimentais do Grupo Odanacatib (GOS):



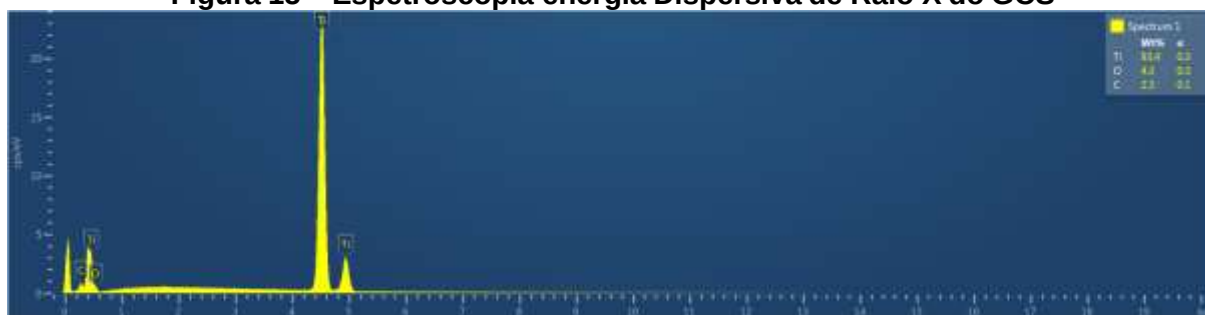
Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2024)

- A) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 100x;
- B) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 1.000x;
- C) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 5.000x;
- D) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 10.000x;

- E) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 20.000x;
 F) Superfície revestida por SBF com Odanacatib (GOS), em aumento de 50.000x;

Na análise de EDS o grupo GCS apresentou uma superfície de Titânio (Ti) puro (93,4%) (Figura 15). Os grupos GXS e GOS apresentaram presença de outras substâncias em diferentes concentrações (Figura 15 e 16). O grupo GXS apresentou maiores concentrações de Cálcio (1,5%), de Fósforo (1,2%), Sódio (2,3%), Carbono (6,5%) e Oxigênio (41%) (Figura 14). No entanto o GOS apresentou maior porcentagem de Titânio (86%) (Figura 17).

Figura 15 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GCS



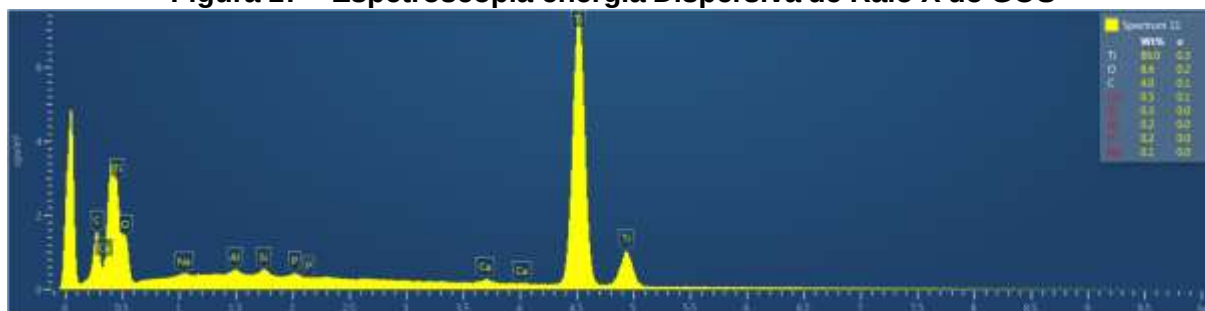
Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2023)

Figura 16 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GXS



Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2023)

Figura 17 – Espetroscopia energia Dispersiva de Raio X do GOS

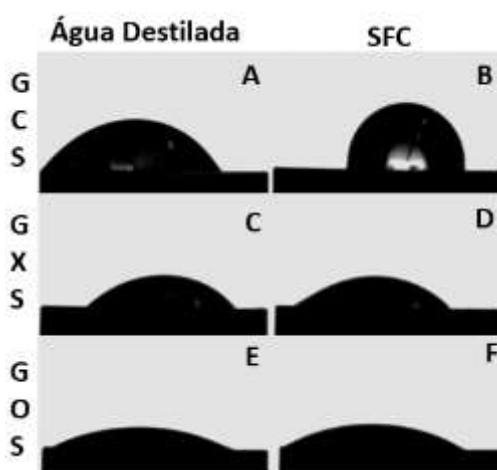


Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2023)

5.2 Análise De Molhabilidade

As superfícies experimentais dos grupos GXS e GOS apresentaram ângulo de contato correspondente a classificação hidrofílica, conferindo um ângulo inferior a 90° , para ambas as soluções testadas (água destilada e SBF). O GOS, por sua vez, apresentou um perfil de maior interação com as soluções, como é possível observar nas imagens a seguir em que houve maior espreadimento dos líquidos em sua superfície em relação ao GXS (Figura 18 C-F). Já o GCS apresentou perfil hidrofílico apenas na solução de água destilada, no SBF apresentou um ângulo superior a 90° mostrando menor interação da solução com a superfície em relação aos demais grupos (Figura 18 A e B) (Gráfico 1).

Figura 18 – Obtenção do ângulo de contato



- A) Ângulo de contato de $52,3^\circ$ obtido no GCS com a solução de água destilada;
- B) Ângulo de contato de $90,7^\circ$ obtido no GCS com SBF;
- C) Ângulo de contato de $49,9^\circ$ obtido no GXS com a solução de água destilada;
- D) Ângulo de contato de $45,7^\circ$ obtido no GXS com SBF;
- E) Ângulo de contato de $29,4^\circ$ obtido no GOS com a solução de água destilada;
- F) Ângulo de contato de $31,4^\circ$ obtido no GOS com SBF;

Fonte: Tensiômetro óptico de ângulo de contato (2024)

Na comparação intergrupos foi possível observar que houve diferença estatística entre o GCS e o GOS para a solução de água destilada ($p=0,0007$), e para SBF entre os grupos GCS e GXS ($p=0,0145$) e GCS e GOS ($p=0,0007$), revelando que o GOS apresentou melhor interação de ambas as soluções em sua superfície (Gráfico1) (Tabela 1).

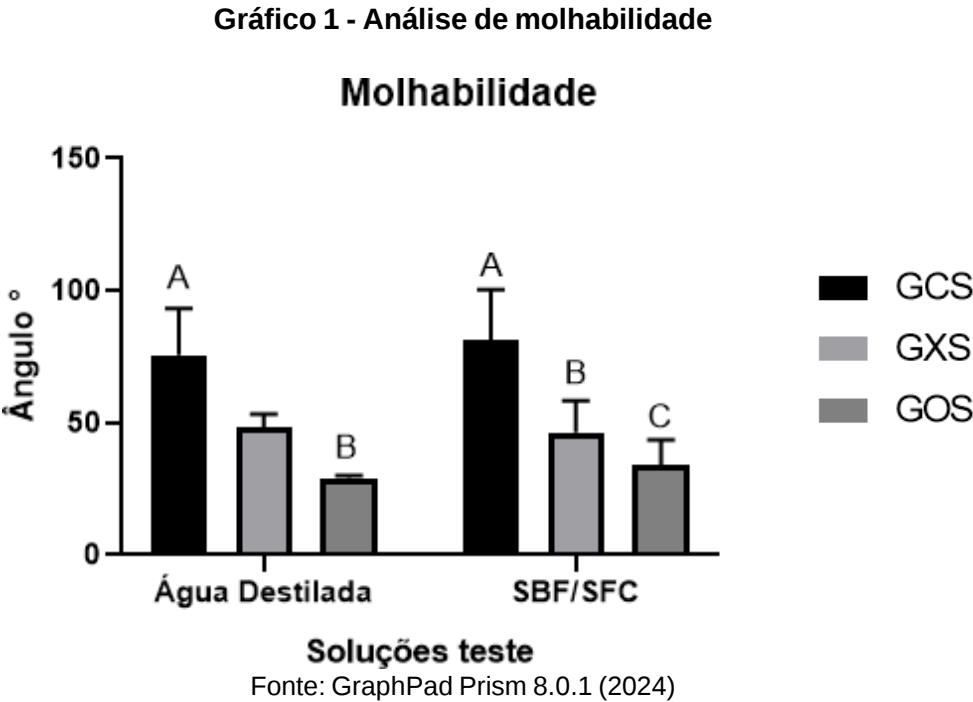


Tabela 1 – Análise estatística da avaliação do ângulo de contato

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

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

Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2024)

5.3 Análise Histológica
5.3.1 Análise do perfil inflamatório – qualitativo

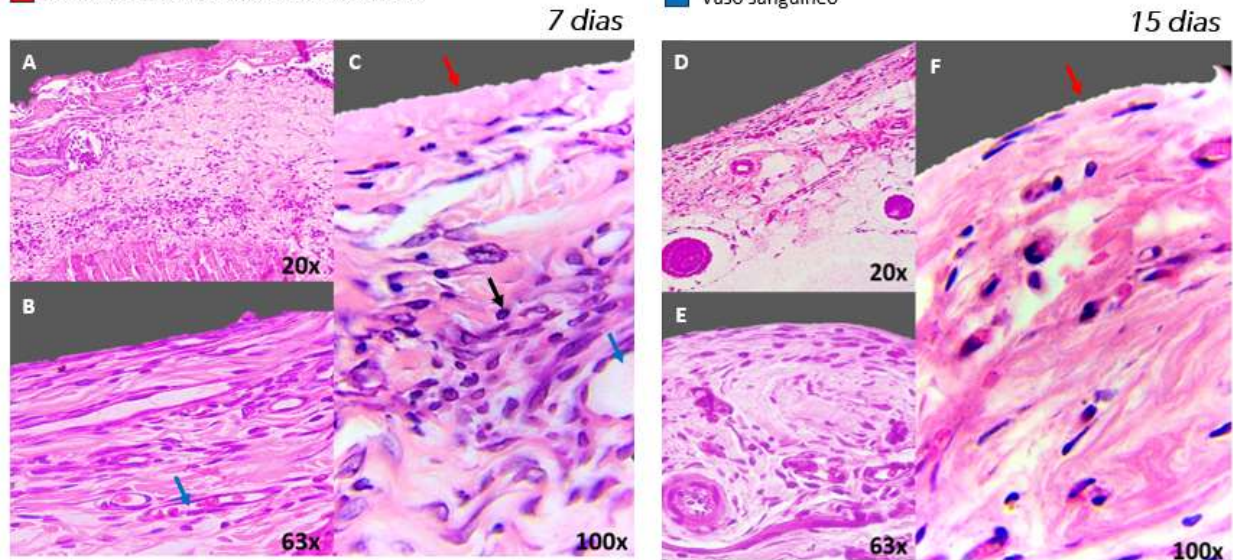
Na análise histológica, pode observar que o GCS e GOS apresentaram a formação de uma cápsula fibrosa mais densa na região de interface disco/tecido conjuntivo em relação ao GXS (Figura 19-21). O GCS expressou um perfil inflamatório moderado aos 7 e aos 15 dias, já o GOS apresentou um infiltrado linfo-plasmático leve aos 7 dias e moderado aos 15 dias. Em que foi possível destacar a presença de extravasamento de hemácias intenso aos 7 dias em relações aos demais grupos (Figura 19). O GXS apresentou uma interface disco/tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório e fibras colágenas em ambos períodos (Figura 20).

Figura 19 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo Controle 7 e 15 dias.

Legenda:

- Área representativa do disco
- Interface da região disco/tecido conjuntivo

- Linfócito
- Vaso sanguíneo



- A) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 7 dias.
 B) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 7 dias
 C) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 7 dias
 D) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 15 dias.
 E) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 15 dias
 F) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco do GCS aos 15 dias

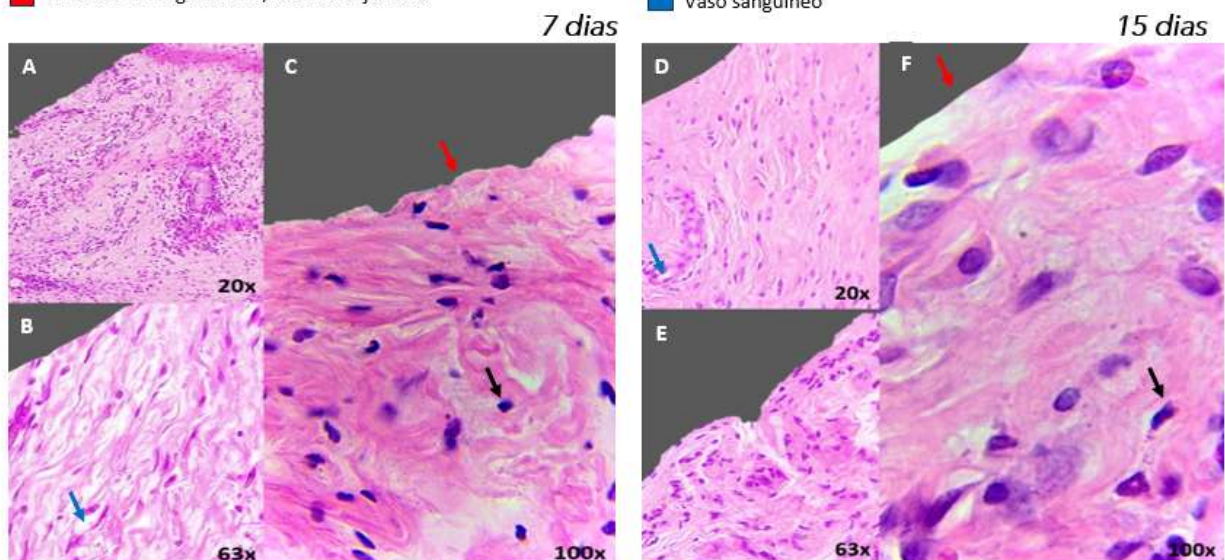
Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 20 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo SBF 7 e 15 dias.

Legenda:

- Área representativa do disco
- Interface da região disco/tecido conjuntivo

- Linfócito
- Vaso sanguíneo



- A) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 7 dias.
 B) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 7 dias
 C) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 7 dias

- D) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 15 dias.
 E) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 15 dias
 F) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco do GXS aos 15 dias

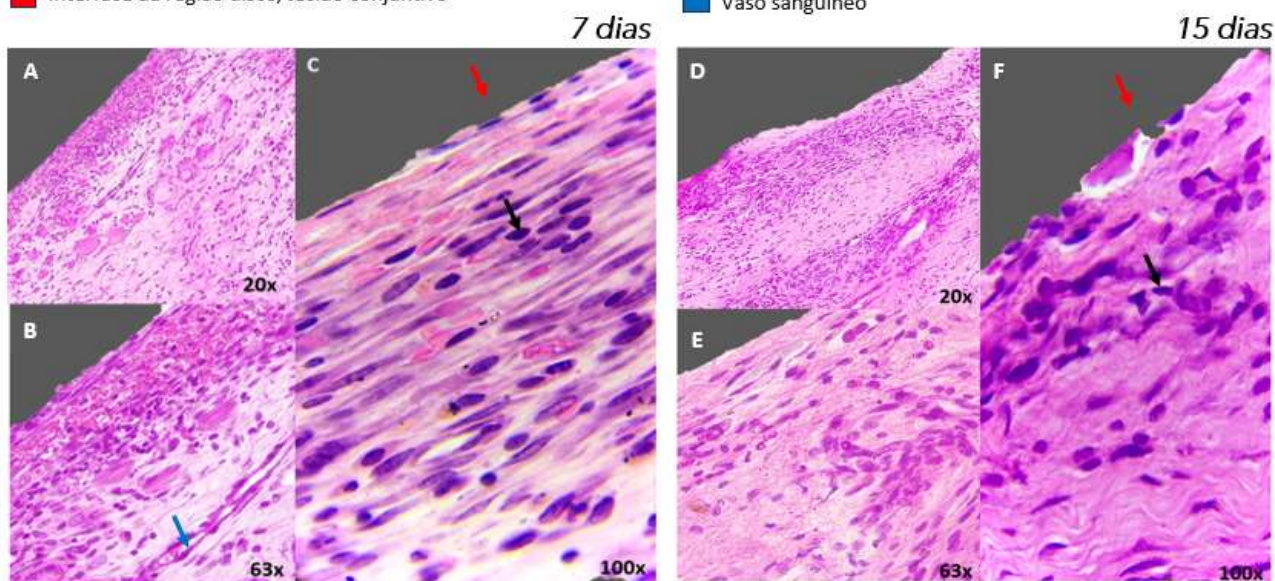
Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 21 – Tecido subcutâneo em região de contato com o disco – Grupo Odanacatib 7 e 15 dias.

Legenda:

- Área representativa do disco
 ■ Interface da região disco/tecido conjuntivo

- Linfócito
 ■ Vaso sanguíneo



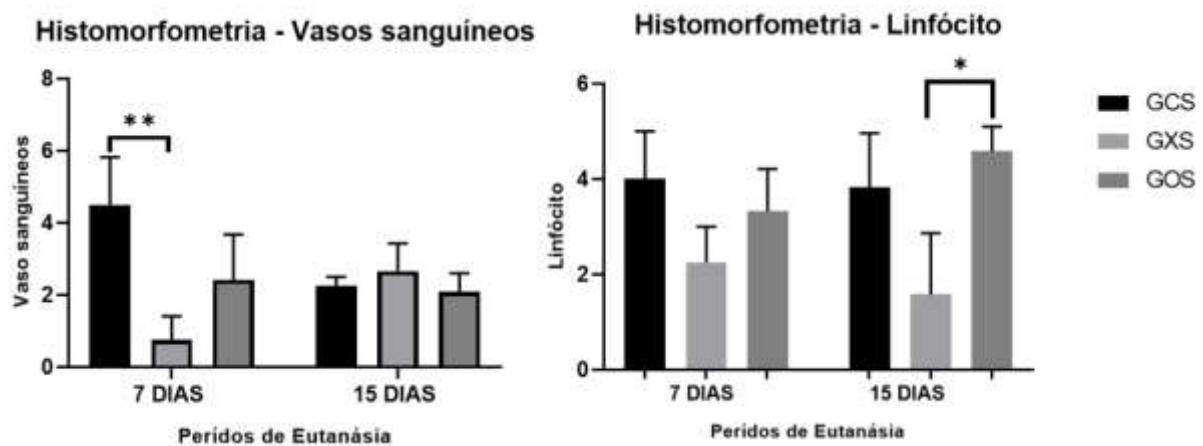
- A) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GOS aos 7 dias.
 B) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do- GOS aos 7 dias
 C) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco do GOS aos 7 dias
 D) Lâmina no aumento de 20x da área subcutânea do contato com o disco do GOS aos 15 dias.
 E) Lâmina no aumento de 63x da área subcutânea do contato com o disco do GOS aos 15 dias
 F) Lâmina no aumento de 100x da área subcutânea do contato com o disco GOS aos 15 dias

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

5.3.2 Análise histomorfométrico

Na avaliação histomorfométrica foi possível observar que o GCS relevou resultados semelhante aos 7 e 15 dias em ambos os parâmetros de avaliação, e apresentando diferença estatística significativa aos 7 dias em relação ao GXS no quesito angiogênese ($p=0,0024$). Para o parâmetro linfocitário o GOS apresentou diferença estatística em relação ao GXS aos 15 dias para o perfil linfocitário ($p=0,226$), destacando o GXS ao revelar menores valores em ambos os períodos (Gráfico 2).

Gráfico 2- Histomorfométrica



Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2024)

Tabela 2 – Análise histomorfométrica (Vasos sanguíneos)

Eutanásia	GCS	GXS	GOS	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
7 dias	4,500± 1,32	0,750±0,66	2,417±1,25	p=0,0024**
15 dias	2,250± 0,25	2,667±0,76	2,083±0,52	

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

Tabela 3 – Análise histomorfométrica (Linfócitos)

Eutanásia	GCS	GXS	GOS	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
7 dias	4,000±1,00	2,250± 0,75	3,333±0,87	p=0,226*
15 dias	3,833±1,12	1,583± 1,28	4,583±0,52	

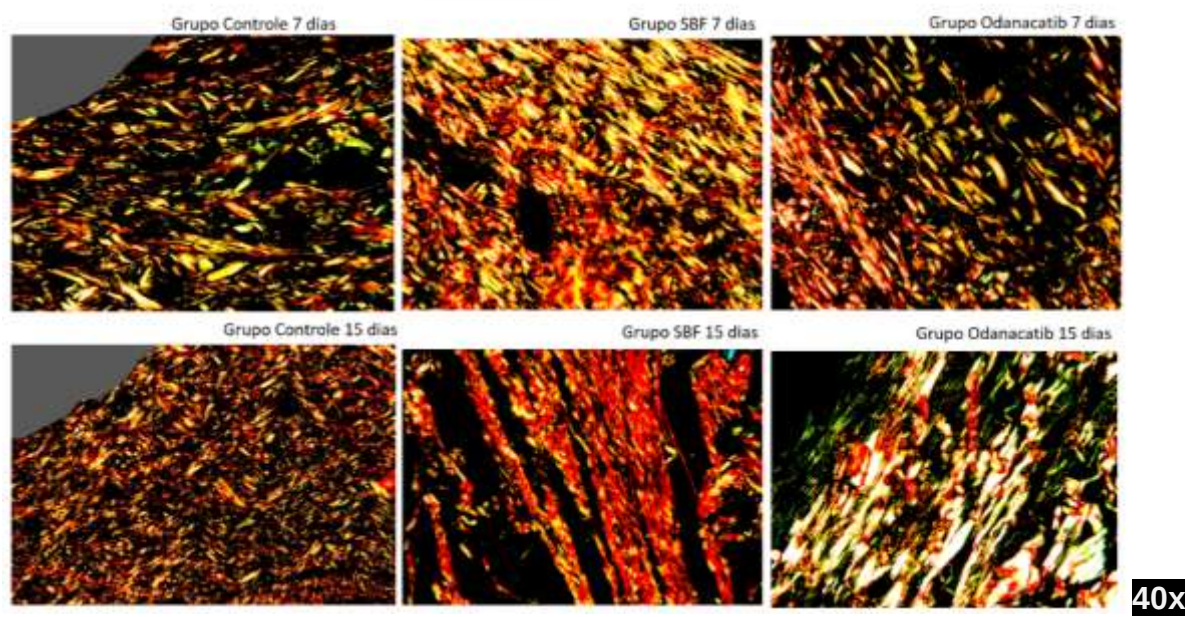
* Valor estatístico significativo ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA TWO AWAY). A, B e C: mostram a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: mostram a diferença entre o período no mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey). MD = média; DP = desvio-padrão;

5.3.4. Análise Picro Sirius RED

Imagens representativas da coloração vermelha do Picrosirius para identificar a maturidade das fibras de colágeno para todos os grupos são mostrados na Figura 20. De acordo com o teste estatístico, entre todos os grupos versus todos os grupos um maior porcentagem de fibras maduras foi observada

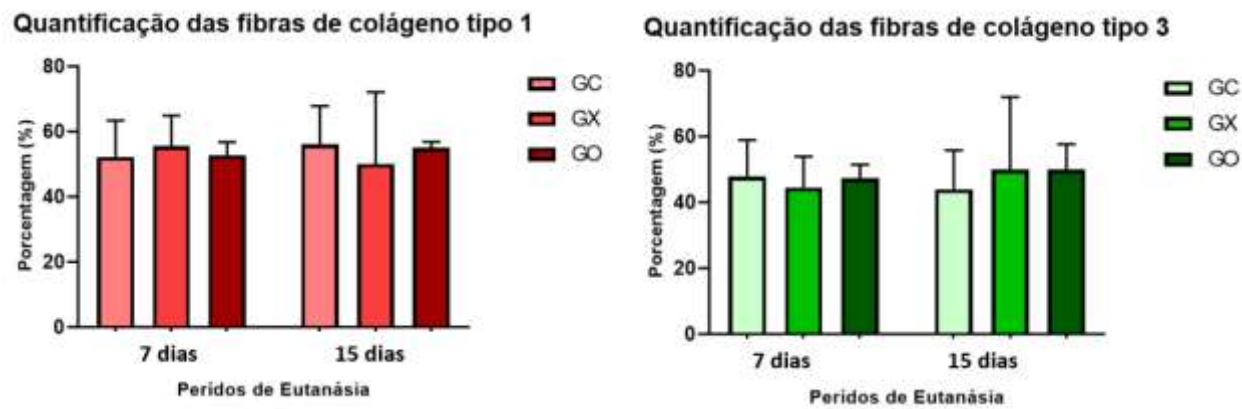
nos grupos tanto aos 7 ($p=0,999$), quanto aos 15 dias ($p=0,999$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos entre em qualquer um dos períodos de análise ($p>0,05$).

Figura 22: Imagens representativas da coloração do Picrosirius red para identificar a maturidade das fibras colágenas



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

Gráfico 3- Quantificação das fibras de colágeno através da análise picrosíriusred



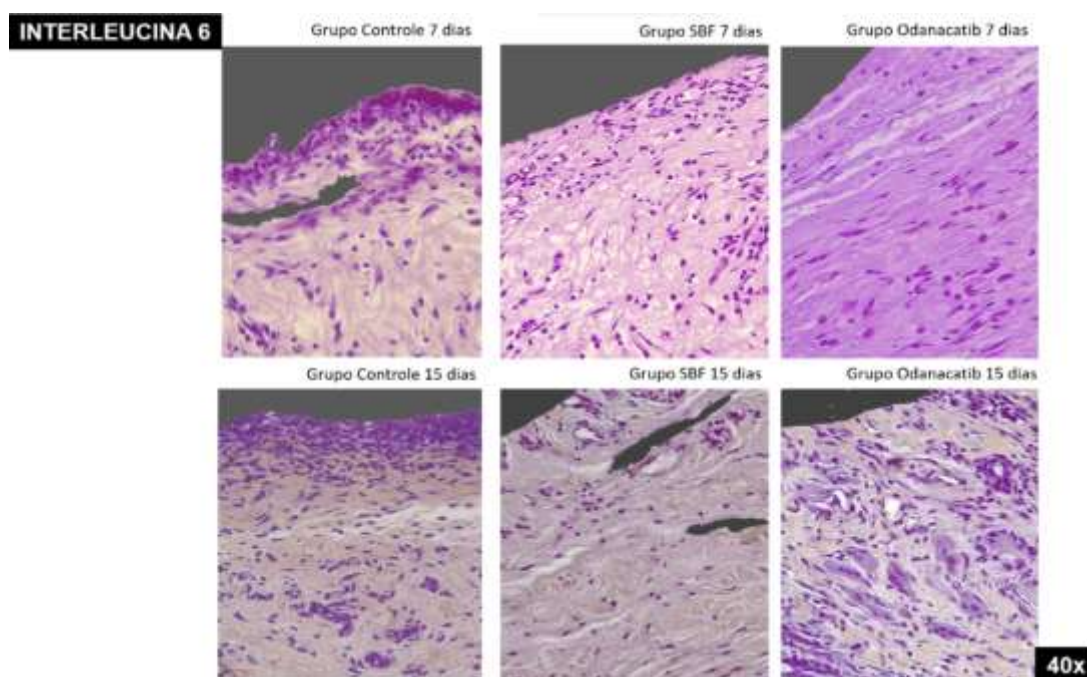
Fonte: GraphPad Prism 8.0.1 (2024)

5.4 Análise de Imunoistoquímica

5.4.1 – Proteína: Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina 6, marcador da resposta inflamatória apresentou ausência de marcação no período de 7 dias e leve aos 15 dias para todos os grupos experimentais avaliados. O que evidência uma baixa resposta inflamatória na presença das variáveis avaliadas neste estudo.

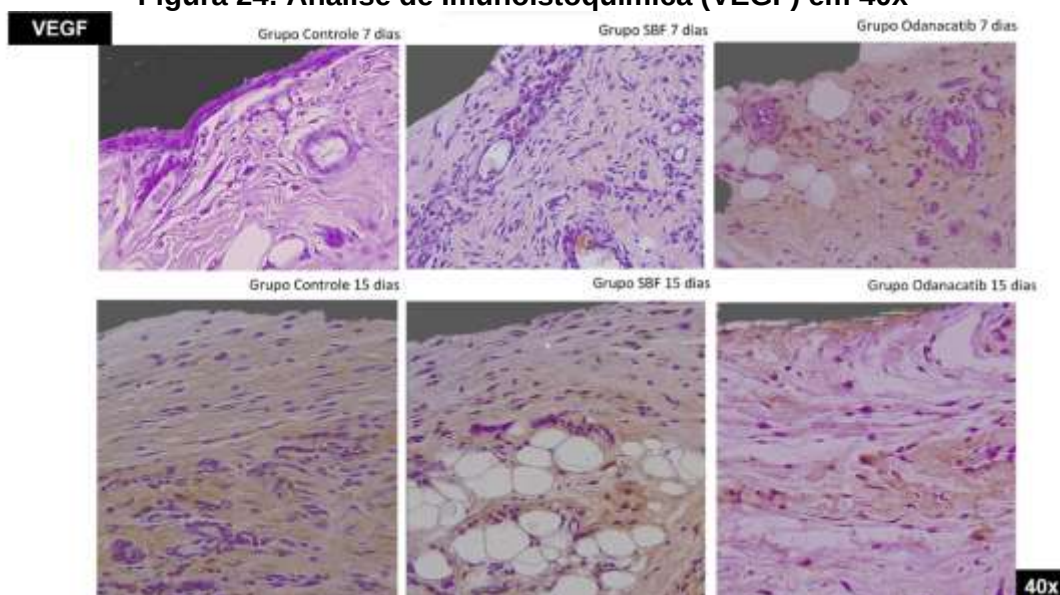
Figura 23: Análise de Imunoistoquímica (Interleucina 6) em 40x.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

5.4.2 – Proteína: VEGF

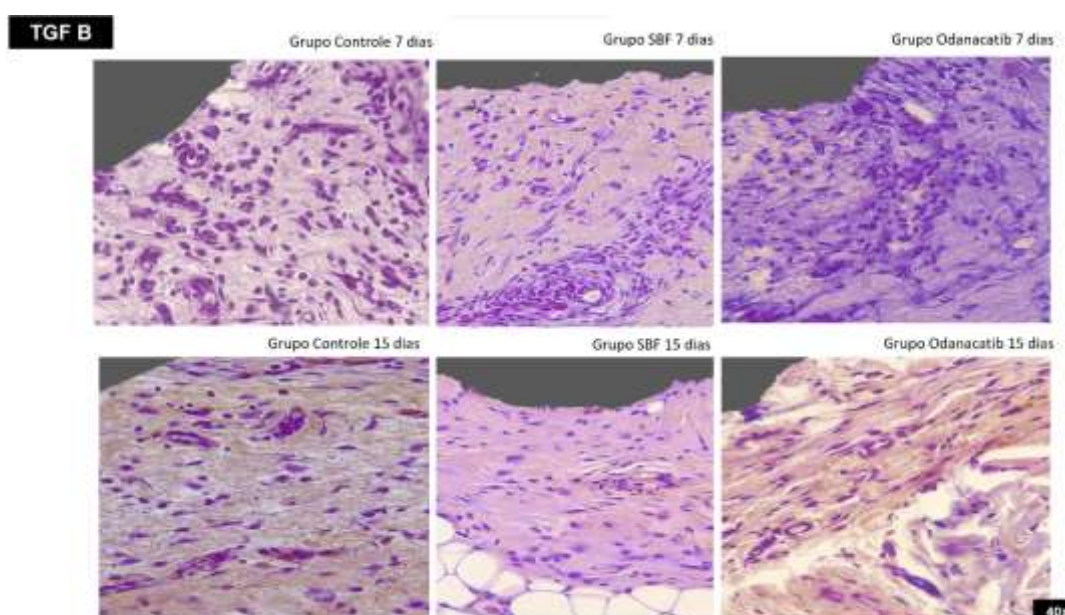
A VEGF, que é um marcador de vascularização tecidual, apresentou ausência de marcação no GCS aos 7 dias, e marcação moderada aos 15 dias, mostrando o potencial para estímulo a neoformação vascular. O GOS revelou marcação leve aos 7 e aos 15 dias e o GXS apresentou ausência de marcação aos 7 e aos 15 dias.

Figura 24: Análise de Imunoistoquímica (VEGF) em 40x

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

5.4.3 – Proteína: TGF- β

O fator de crescimento transformador- β (TGF- β), um mediador do crescimento prostático, induz a angiogênese e inibe a proliferação celular. A TGF- β apresentou ausência de marcação aos 7 dias e moderada aos 15 dias para o GCS. O GOS, também, apresentou ausência de marcação aos 7 dias e marcação leve aos 15 dias. Já o GXS revelou ausência de marcação em ambos os períodos avaliados.

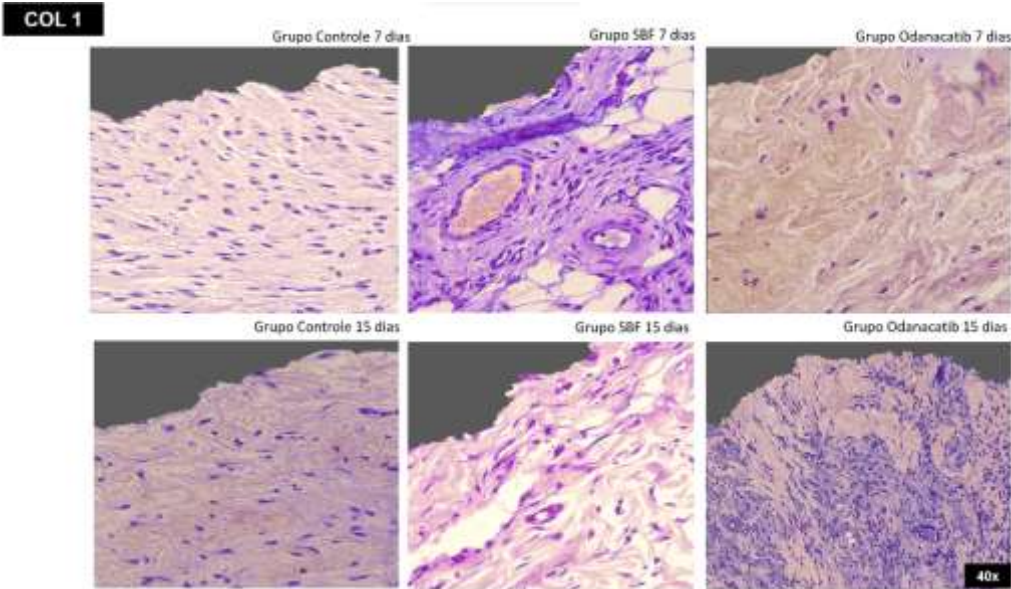
Figura 25: Análise de Imunoistoquímica (TGF B) em 40x

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

5.4.4 – Proteína: COL1

O colágeno tipo 1 apresentou marcação moderada aos 7 dias e leve aos 15 dias para o GOS e para os demais grupos, GCS e GXS revelaram ausência de imunomarcação em ambos os períodos avaliados.

Figura 26: Análise de Imunoistoquímica (COL1) em 40x



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

Tabela 4 – Imunomarcação

Proteínas Analisadas	IL 6	IL 6	VEGF	VEGF	TGF-B	TGF-B	COL 1	COL 1
Períodos de Eutanasia	7 dias	15 dias	7 dias	15 dias	7 dias	15 dias	7 dias	15 dias
Grupos								
GCS	Ausente	Leve	Ausente	Moderado	Ausente	Moderado	Ausente	Ausente
GOS	Ausente	Leve	Moderado	Leve	Ausente	Leve	Moderado	Leve
GXS	Ausente	Leve	Ausente	Moderado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor (2024)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de analisar a resposta biológica de uma superfície de implante modificada com ODN, comparando-a com a superfície de duplo ataque ácido e biomimética em condições normofisiológicas. De acordo com a hipótese proposta, os resultados foram esclarecedores para entender o comportamento das superfícies testadas, atribuindo uma visão mais precisa diante do comportamento biológico, quando em íntimo contato com o tecido conjuntivo. Em que foi possível avaliar que a ação tópica do ODN no tecido conjuntivo não resulta em efeitos adversos.

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

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

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

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

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

Estudos comprovam que o padrão de superfície esta diretamente relacionada ao comportamento celular, e em concordância com as análises *in vitro*, as análises histológica, histomorfométrica, imunoistoquímica e de picrosíriusred foi possível destacar os grupos GXs e GOS. Em que os grupos apresentaram maior expressão de fibras colágenas maduras e imunomarcacão leve/ausente para IL-6, TGF- β e para ambos os períodos e moderado para VEGF aos 15 dias. No entanto, o GOS apresentou uma cápsula fibrosa mais densa na região de interface disco/tecido conjuntivo em relação ao GXs, além de um perfil inflamatório leve aos 7 dias e moderado aos 15 dias, o que corrobora com imunomarcacão moderada para Col-1 aos 7 dias.

Embora o ODN seja um inibidor da CTsk mais seletivo que o balicatib (*outro inibidor de CTsk*), estudos relevam que o tratamento sistêmico com o ODN apresenta risco semelhante de Eas cutâneo. No entanto no presente estudo, foi possível

observar que o uso tópico do ODN apresentou um perfil inflamatório leve a moderado, potencial angiogênico aos 15 dias, maior expressão de fibras colágenas maduras (equilavante ao GXS e GCS) e expressão ausente/leve de IL-6. O que corrobora com a revisão Chen e colaboradores de 2023 que não encontrou diferença estatística significativa dos Eas cutâneos e totais entre o grupo ODN e o grupo placebo.

Outro estudo de Rünger, Quintanilla- Dieck e Bhawan de 2007 forneceu evidências de que a CTsK desempenha um papel importante na homeostase da matriz extracelular dérmica. Corroborando com os Eas ocasionado pelo Balicatib, provavelmente relacionada à deposição excessiva de proteínas da matriz extracelular na derme. Este comportamento não foi encontrado nas presentes análises em tecido subcutâneo. Portanto, é muito provável que a morfeia induzida pelo balicatib possa estar relacionada à deposição excessiva de proteínas da matriz extracelular na derme.

Além disso, a inibição da CTsK prejudica a resposta imune adaptativa, o que consequentemente resulta na redução das citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a IL-6. O mesmo comportamento foi observado na imunomarcagem da IL-6 e no período de 7 dias na análise de histomorfometria no GOS. Esta redução da resposta imune adaptativa influencia diretamente os osteoclastos, resultando na redução da sua ativação e diferenciação.

Os antireabsortivos como o ODN, também podem reduzir a magnitude do desequilíbrio das unidades multicelulares básicas, reduzindo a vida útil do osteoclasto e aumentando a vida útil do osteoblasto. O aumento na densidade mineral do tecido pode aumentar a rigidez do osso, permitindo o acúmulo e a propagação de microdanos, uma vez que o osso mineralizado de forma mais homogênea é menos resistente à propagação de fissuras (ou seja, o osso se torna menos resistente). Além de reduzirem a taxa de remodelação óssea. Menos locais escavam osso em suas superfícies endosteais (trabecular, endocortical, intracortical), de modo que menos volume existente do esqueleto mineralizado é "revirado". A taxa de remodelação reduzida resulta na desaceleração da progressão do adelgaçamento trabecular e cortical, perfuração trabecular e porosidade cortical.

Com isso, estudo relevou que a superfície modificada com ODN não apresentou efeitos colaterais cutâneos, apresentando resultados semelhantes a

superfície tratada com SBF. Além de corroborar com as análises de resposta óssea, o qual indicou a efetividade das três superfícies, destacando a superfície modificada com ODN. Ademais, atendendo as limitações deste estudo, a análise de cultura de células com células mesenquimais de linhagem osteoblásticas de rato (MC3T3-E1 e SAOS-2) estão em andamento para mapear o comportamento das superfícies tratadas, quanto a toxicidade, inflamação e mineralização. Além de avaliar a atividade, por meio do “*Cathepsin K Inhibitor Screening Assay Kit*”, da protease de Cathepsin K incorporada na superfície de titânio. Trazendo uma visão mais completa inteirando as análises já realizadas, com intuito de acrescentar na literatura estudos de ação tópica.

7 CONCLUSÃO

As modificações de superfície propostas neste trabalho mostraram serem seguras quando em íntimo contato com o tecido conjuntivo em organismos normofisiológicos. Indicando que o ODN não apresentou efeitos colaterais cutâneos, conferindo resultados otimizados nas análises de topografia e ângulo de contato em relação aos demais grupos experimentais, e resultados semelhantes a superfície biomimética na análise de biocompatibilidade aos 7 e aos 15 dias.

REFERÊNCIAS

Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *J Mater Sci Mater Med*. 1990; 1:233–8. doi: 10.1007/BF00701082.

Aparecida AH, Fook MVL, Santos ML, Guastaldi AC. Influência dos íons K⁺ e Mg²⁺ na obtenção de apatitas biomiméticas. *Eclética Quím*. 2005;30(4):13–8. doi: 10.1590/S0100-46702005000400002.

Barbosa TP. Características funcionais de implantes dentários: topografia superficial e molhabilidade [dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2016.

Bone HG, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, et al. Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res*. 2010;25(5):937-47. doi: 10.1359/jbmr.091035.

Boonen S, Rosenberg E, Claessens F, Vanderschueren D, Papapoulos S. Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(1):73-9. doi: 10.1007/s11914-011-0085-9.

Brömme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(5):585-600. doi: 10.1517/13543780902832661.

Bruzzone AAG, Costa HL, Lonardo PM, Lucca DA. Advances in engineered surfaces for functional performance. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*. 2008;57(2):750-69. doi: 10.1016/j.cirp.2008.09.003

Cabal A, Jayakar RY, Sardesai S, Phillips EA, Szumiloski J, Posavec DJ, et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomography and finite element analysis of bone strength at the distal radius in ovariectomized adult rhesus monkey demonstrate efficacy of odanacatib and differentiation from alendronate. *Bone*. 2013;56(2):497-505. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.011.

Chapurlat RD, Arlot M, Burt-Pichat B, Chavassieux P, Roux JP, Portero-Muzy N, et al. Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women

on long-term bisphosphonates: a bone biopsy study. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1502-9. doi: 10.1359/jbmr.070609.

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

Cruz, M.B.; Silva, N.; Marques, J.F.; Mata, A.; Silva, F.S.; Caramês, J. Biomimetic Implant Surfaces and Their Role in Biological Integration—A Concise Review. *Biomimetics* 2022, 7, 74. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7020074>

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

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

Espósito, M.; Ardebili, Y.; Worthington, HV Intervenções para substituição de dentes perdidos: Diferentes tipos de implantes dentários. Sistema de banco de dados Cochrane. Rev. 2019, 2019, CD003815. [RefCruz] [Pub Med]

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

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

Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A, et al. Micro- topography

and reactivity of implant surfaces: an in vitro study in simulated body fluid (SBF). *Microsc Microanal.* 2015;21(1):190-203. doi: 10.1017/S1431927614014615.

Gil, J.; Manero, J.M.; Ruperez, E.; Velasco-Ortega, E.; Jiménez-Guerra, A.; Ortiz-García, I.; Monsalve-Guil, L. Mineralization of Titanium Surfaces: Biomimetic Implants. *Materials* 2021, 14, 2879. <https://doi.org/10.3390/ma14112879>

Khan MP, Singh AK, Singh AK, Shrivastava P, Tiwari MC, Nagar GK, et al. Odanacatib restores trabecular bone of skeletally mature female rabbits with osteopenia but induces brittleness of cortical bone: a comparative study of the investigational drug with PTH, estrogen, and alendronate. *J Bone Miner Res.* 2016;31(3):615-29. doi: 10.1002/jbmr.2719.

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

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amourig Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007;23(7):844-54. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.025.

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

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

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

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

Mcclung M, Langdahl B, Papapoulos S, Saag KG, Adami S, Bone HG, et al. Odanacatib anti-fracture efficacy and safety in postmenopausal women with

osteoporosis. Results from the phase III long-term odanacatib fracture trial (LOFT). *J Bone Miner Res.* 2014;29(Suppl 1):S51.

Merck. Merck Announces Data from Pivotal Phase 3 Fracture Outcomes Study for Odanacatib, an Investigational Oral, Once-Weekly Treatment for Osteoporosis. 2014 [cited 23 nov 2023]. Available from: <https://www.merck.com/news/merck-announces-data-from-pivotal-phase-3-fracture-outcomes-study-for-odanacatib-an-investigational-oral-once-weekly-treatment-for-osteoporosis/>

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

Nicolas-Silvente, AI; Velasco-Ortega, E.; Ortiz-Garcia, I.; Monsalve-Guil, L.; Gil, J.; Jiménez-Guerra, A. Influência do tratamento superficial do implante de titânio na rugosidade superficial e composição química. *Materiais* 2020, 13, 314.

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

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

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

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

Rongjin Chen1,; Changshun Chen.; Bin Geng1.; Chenhui Yang1.; Hefang Xiao.; Fei Yang.; Hao Wang.; Yayi Xia1. Efficacy and safety of odanacatib for osteoporosis treatment: a systematic review and meta-analysis Received: 9 January 2023 /

Accepted: 28 April 2023 / Published online: 11 May 2023 © International Osteoporosis Foundation and Bone Health and Osteoporosis Foundation 2023

Santos, A.F.P.; Cervantes, L.C.C.; Okamoto, R.; Guastaldi, A.C.; Queiroz, T.P.; Panahipour, L.; Gruber, R.; Souza, F.Á. Interleukin-6 Expression of Osteogenic Cell Lines Grown on Laser-Treated and Hydroxyapatite-Coated Titanium Discs. *Appl. Sci.* 2023, 13, 12646. <https://doi.org/10.3390/app132312646>

Silva FC, Silva JL, Morgado FN. The binomial parasite-host immunity in the healing process and in reactivation of human tegumentary leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2018;9:1308. doi: 10.3389/fmicb.2018.01308.

Sivolella S, Brunello G, Ferroni L, Berengo M, Meneghello R, Savio G, et al. A novel in vitro technique for assessing dental implant osseointegration. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016;22(2):132-41. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0158.

Stefan et al., 2007). Le Guéhennec L, Soueidan ALP, Amouri QY. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *J. Dent. Mater.*, v. 23, n. 7, 2007: 844-854

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

Stoch SA, Zajic S, Stone J, Miller DL, Van Dyck K, Gutierrez MJ, et al. Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on bone resorption biomarkers in healthy postmenopausal women: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase I studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(2):175-82. doi: 10.1038/clpt.2009.60.

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

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

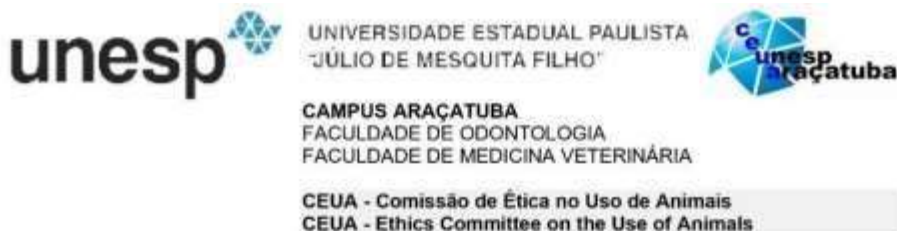
Yuan Y, Lee TR. Contact angle and wetting properties. In: Bracco G, Holst B, editors. Surface science techniques. Berlin: Springer; 2013. p. 33-4. doi: 10.1007/978-3-642-34243-1.

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

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

ANEXO

Anexo A – Comitê de Ética no Uso Animal



CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 01 de Abril de 2023.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 01, 2023.

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


Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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