



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021019134-1 A2

(22) Data do Depósito: 24/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
11/04/2023

(54) Título: FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

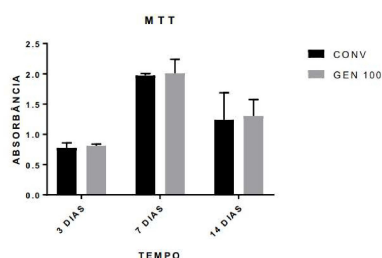
(51) Int. Cl.: A61L 27/36.

(52) CPC: A61L 27/3637; A61L 27/3683.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): ROBERTA OKAMOTO; PAULO NORONHA LISBOA FILHO; IGOR LEBEDENCO KITAGAWA; NAARA GABRIELA MONTEIRO; JAQUELINE SUEMI HASSUMI; FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA.

(57) Resumo: FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS. O presente pedido de patente de invenção consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes ósseointegráveis), utilizando uma molécula bioativa que promove respostas favoráveis ao processo de reparo perimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na Genisteína, um agonista da via MAPK, que atua sinalizando respostas celulares relacionadas a diferenciação osteoblástica e melhorando o aporte sanguíneo local, de forma a contribuir de forma positiva ao processo de reparo perimplantar. A ideia é ativar as respostas celulares no leito receptor do implante ósseointegrável, contribuindo para que haja uma melhora no processo de forma ao do tecido ósseo perimplantar, possibilitando uma melhora na qualidade e na quantidade do tecido ósseo operacional.



FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEÍNA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *LAYER BY LAYER* COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se à funcionalização da superfície de implantes com Genisteína, através da técnica de *Layer by Layer* como estratégia para a melhora do processo de reparo perimplantar em ratas.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado na confecção de implantes osseointegráveis com a superfície ativada pelo agonista MAPK.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] Estudos na literatura mostram que a genisteína já foi adicionada a biomateriais para o preenchimento de defeitos cirúrgicos (Sarkar *et al*, Acta Biomaterialia 2020 e Wang, X *et al*, Biotechnol. Lett (2020). No entanto, referente à utilização da genisteína como proposto neste pedido de patente de invenção onde é incorporada à superfície dos implantes, ainda não foi apresentada em nenhuma base de dados.

NOVIDADE DA INVENÇÃO

[004] A novidade deste dispositivo consiste em promover a funcionalização da superfície dos implantes com uma molécula que tem a atuação em nível celular e que, portanto, no sítio cirúrgico, será capaz de desencadear respostas que possam favorecer o processo de reparo perimplantar. A genisteína possui mecanismos de ação que favorecem duplamente o processo de reparo ósseo, seja pelo seu efeito liberador de óxido nítrico, melhorando o aporte sanguíneo no sítio reparacional, seja o seu efeito como agonista de uma via de sinalização que estimula osteoblastos e, portanto, favorece o processo de formação óssea. A ideia é que estas propriedades, junto à superfície do implante possam melhorar a resposta de osseointegração seja em pacientes saudáveis, seja em pacientes com comprometimento sistêmico. Os estudos mencionados anteriormente falam da genisteína adicionada a biomateriais utilizados para reconstruções ósseas. A nossa proposta é aproveitar as suas propriedades e

adicioná-la diretamente ao implante que será instalado no paciente e que será a base para os procedimentos reabilitadores futuros nos pacientes.

[005] A intenção é que esta tecnologia, uma vez que tenha sua comprovação quanto a segurança e eficácia, seja comercializada e disponibilizada para a população. O intuito é favorecer e acelerar o processo de osseointegração, melhorando a quantidade e principalmente a qualidade do tecido ósseo, frente a condições fisiológicas que podem ser encontradas na população: osteoporose, senescência são importantes exemplos.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[006] O presente pedido de patente de invenção tem por objetivo funcionalizar a superfície dos implantes com o fitoestrógeno Genisteína, através da técnica *layer by layer* (LBL). A escolha da genisteína como biomolécula funcionalizadora deu-se em função do seu papel como agonista da via MAPK, consequentemente atuando com efeito positivo direto sobre a atividade osteoblástica bem como a vasodilatação local, eventos que têm ação sinérgica sobre o processo de formação do tecido ósseo reparacional.

PROBLEMA A SER RESOLVIDO

[007] A melhora do processo osseointegração, inclusive considerando-se a possibilidade de aceleração desta resposta em função das respostas celulares ativadas pela genisteína.

DIFERENCIAL

[008] O diferencial da tecnologia proposta é a possibilidade de desenvolver superfícies de implantes mais específicas para o leito receptor dos pacientes. Um planejamento individualizado das cirurgias de instalação de implantes será de grande valia para que se possa obter respostas favoráveis quanto a osseointegração e otimizando o período entre cirurgia de instalação de implantes e procedimentos reabilitadores.

[009] Atualmente o mercado tem-se voltado para a utilização de superfícies biologicamente ativadas como a superfície acqua da Neodent, a superfície SLA active da Strauman. No entanto, considera-se que o diferencial do presente pedido de patente de invenção está na superfície que consiste na incorporação de uma molécula que tem um efeito agonista sobre as células do leito receptor dos implantes, ativando tanto a

produção do tecido ósseo como melhorando o fluxo sanguíneo local. Estas duas respostas contribuem de forma sinérgica ao processo de reparo ósseo e consequentemente, promoverão uma melhora no processo de reparo periimplantar.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[010] O processo para o desenvolvimento da tecnologia iniciou-se a partir da realização de testes em culturas de células que permitiram avaliar se a concentração testada de 100uM de genisteína seria capaz de promover o estímulo para a formação de nódulos de mineralização sem prejudicar o metabolismo e a viabilidade das células mesenquimais indiferenciadas. Os experimentos foram realizados utilizando-se discos de titânio funcionalizados com a genisteína 100uM através da técnica de *layer by layer* e mostrarem que esta concentração permitiu que nódulos de mineralização fossem formados, preservando o metabolismo e a viabilidade celular. A etapa seguinte constitui na validação desta superfície funcionalizada em experimentos in vivo, onde implantes de titânio funcionalizados com a genisteína 100uM através a técnica *layer by layer*, foram instalados em alvéolos pós exodônticos de ratas. A avaliação da resposta de osseointegração foi realizada pelos valores de contratorque obtidos durante a remoção dos implantes e mostraram que os valores necessários para remover os implantes funcionalizados com genisteína foram significativamente maiores do que os valores observados para os implantes de superfície convencional.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[011] O presente pedido de patente de invenção tem por objetivo utilizar a técnica *layer by layer* (LBL) para incorporar a genisteína à superfície dos implantes. A técnica consiste na adsorção de polieletrólitos ou nanopartículas em um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície). A carga do material a ser adsorvido deve ser contrária à do substrato para que ocorra a adsorção por atração eletrostática. Ao adsorver à superfície do substrato, parte da carga do material adsorvido não é compensada, invertendo a carga resultante da superfície e permitindo a adsorção de outro material de carga distinta ao anterior. Cada nova adsorção implica no crescimento de uma camada no material adsorvido sendo regido pelas ligações iônicas, podendo haver significativa contribuição de ligações covalentes, ligações de

hidrogênio, ligações de Van der Waals, dentre outras. [012] Para o desenvolvimento do dispositivo aqui descrito, para fins de utilização como implante odontológico, foram utilizados o dióxido-de-titânio (TiO_2), o Poli 4-estireno-sulfonato de sódio (PSS) e a genisteína.

[013] O TiO_2 foi obtido através de uma rota sol-gel e dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico (HCL), pH 2.5. Neste pH, o TiO_2 possui carga positivo. O PSS foi dissolvido também em solução aquosa de HCl, pH 2,5, possuindo carga negativa em sua cadeia. Um filme de LBL de PSS e TiO_2 foi crescido na superfície do implante, dando origem a um dispositivo de ancoragem para a genisteína. Vale destacar que a genisteína possui em sua estrutura algumas hidroxilas que podem se transformar em sítios negativos. Como consequência, o filme LBL seguiu a seguinte sequência: uma camada de PSS e uma camada de TiO_2 seguido da genisteína, considerando a presença dos sítios negativos.

[014] Inicialmente a técnica LBL foi realizada em discos de titânio com tratamento de superfície convencional (duplo ataque ácido) e foi realizada a comparação desta superfície como controle com a superfície que recebeu a genisteína em LBL, na concentração de 100uM. Foram realizados testes *in vitro*, avaliando o comportamento de células mesenquimais indiferenciadas quando em contato com as duas superfícies: convencional ou LBL genisteína. Para o ensaio de MTT foi observado que o metabolismo celular foi mantido, sem prejuízo da viabilidade celular. Para o ensaio que avaliou a formação dos nódulos de mineralização, foi possível observar que a concentração testada permitiu que houvesse formação de nódulos de mineralização num padrão semelhante ao disco de titânio, comprovante a bioatividade desta superfície quanto ao processo de formação de tecido ósseo *in vitro*.

[015] A etapa seguinte consistiu em realizar os experimentos *in vivo* onde implantes de titânio foram instalados na maxila de ratas sem comprometimento sistêmico. Foi comparada a superfície convencional com a superfície funcionalizada por LBL genisteína. As ratas foram submetidas a exodontia do 1º molar superior e na sequência, os implantes convencionais ou LBL genisteína, foram instalados no sítio cirúrgico de forma imediata. Após 28 dias, foi realizado o experimento de torque de

remoção, onde com um torquímetro digital foi avaliada a força necessária para remover os implantes. Constatou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa entre as duas superfícies testadas e o desempenho do LBL genisteína foi superior a convencional, mostrando que a funcionalização da superfície com esta biomolécula promoveu uma melhora na quantidade e qualidade do tecido ósseo perimplantar.

[016] A Figura 1A apresenta os resultados referentes ao MMT onde foi avaliado o metabolismo celular das células em contato com a concentração de 100uM de genisteína, (tratamento) aos 3, 7 e 14 dias (tempo), após o plaqueamento. Quando avaliada a interação entre os fatores Tratamento e Tempo, não foi observada interação entre estes ($p=0,9926$) e observou-se a diferença estatisticamente significativa na variável tempo ($p<0,0001$). Pode-se observar que, aos 7 dias, observa-se maior absorvância em comparação aos demais períodos avaliados.

[017] A Figura 1B apresenta os valores representativos de viabilidade celular, em porcentagem, calculada a partir dos valores de absorvância para as superfícies convencional e genisteína 100uM. Valores acima de 70% mostram que a viabilidade celular é preservada.

[018] A Figura 2 apresenta os resultados referentes a formação de nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento das células sobre as superfícies funcionalizadas com a genisteína 100uM neste estudo. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies testadas ($p<0,05$). No entanto, maiores valores numéricos são observados no grupo gen 100uM.

[019] A Figura 3 apresenta os valores médios de torque de remoção aos 28 dias, após a instalação de implantes convencionais em comparação aos implantes funcionalizados com Teriparatida, em animais SHAM. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as superfícies Gen e Convencional (teste t não pareado, $p<0,05$). Estes resultados mostram que a superfície funcionalizada com genisteína 100uM melhorou a resposta de osseointegração.

[020] O diferencial da tecnologia proposta é a possibilidade de desenvolver superfícies de implantes mais específicas para o leito receptor dos pacientes. Um planejamento individualizado das cirurgias de instalação de implantes será de grande valia para que

se possa obter respostas favoráveis quanto a osseointegração e otimizando o período entre cirurgia de instalação de implantes e procedimentos reabilitadores.

[021] Uma possível desvantagem seria o tempo de prateleira destes implantes funcionalizados. No entanto, considera-se que este tempo curto será compensada pelos efeitos biológicos quanto às respostas reparacionais.

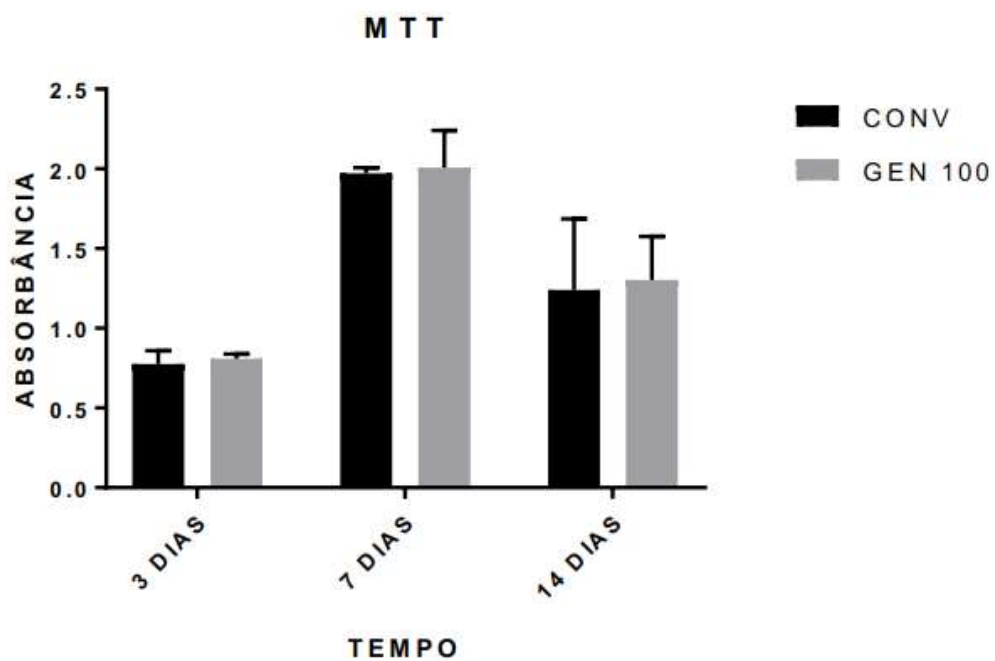
[022] A técnica para realizar o LBL com a genisteína é relativamente rápida e não tem grandes custos. Portanto, se houver um bom planejamento na logística, este problema será facilmente contornável.

REIVINDICAÇÕES

1. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEÍNA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *LAYER BY LAYER* COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS, a dita funcionalização **caracterizada por** utilizar a técnica *layer by layer* (LBL) para incorporar a genisteína à superfície dos implantes; em que a dita técnica consiste na adsorção de polieletrólitos ou nanopartículas em um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície); em que a carga do material a ser adsorvido deve ser contrária à do substrato para que ocorra a adsorção por atração eletrostática; em que ao adsorver à superfície do substrato, parte da carga do material adsorvido não é compensada, invertendo a carga resultante da superfície e permitindo a adsorção de outro material de carga distinta ao anterior; em que cada nova adsorção implica no crescimento de uma camada no material adsorvido sendo regido pelas ligações iônicas, podendo haver significativa contribuição de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, dentre outras; em que o dióxido-de-titânio (TiO₂), o Poli 4-estireno-sulfonato de sódio (PSS) e a genisteína foram utilizados; em que o TiO₂ foi obtido através de uma rota sol-gel e dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico (HCL), pH 2.5; em que neste pH, o TiO₂ possui carga positiva; em que o PSS foi dissolvido também em solução aquosa de HCl, pH 2,5, possuindo carga negativa em sua cadeia; em que um filme de LBL de PSS e TiO₂ foi crescido na superfície do implante, dando origem a um dispositivo de ancoragem para a genisteína; em que inicialmente a técnica LBL foi realizada em discos de titânio com tratamento de superfície convencional (duplo ataque ácido) e foi realizada a comparação desta superfície como controle com a superfície que recebeu a genisteína em LBL, na concentração de 100uM; em que foram realizados testes *in vitro*, avaliando o comportamento de células mesenquimais indiferenciadas quando em contato com as duas superfícies: convencional X LBL genisteína; em que para o ensaio de MTT foi observado que o metabolismo celular foi mantido, sem prejuízo da viabilidade celular; em que para o ensaio que avaliou a formação dos nódulos de mineralização, foi possível observar que a concentração testada permitiu que houvesse formação de

nódulos de mineralização num padrão semelhante ao disco de titânio, comprovante a bioatividade desta superfície quanto ao processo de formação de tecido ósseo *in vitro*.

2. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *LAYER BY LAYER* COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** etapa seguinte consistir em realizar os experimentos *in vivo* onde implantes de titânio foram instalados na maxila de ratas sem comprometimento sistêmico; em que é comparada a superfície convencional com a superfície funcionalizada por LBL genisteína; em que as ratas são submetidas a exodontia do 1º molar superior e na sequência, os implantes convencionais ou LBL genisteína, são instalados no sítio cirúrgico de forma imediata; em que após 28 dias, é realizado o experimento de torque de remoção, onde com um torquímetro digital é avaliada a força necessária para remover os implantes.

**FIGURA 1A**

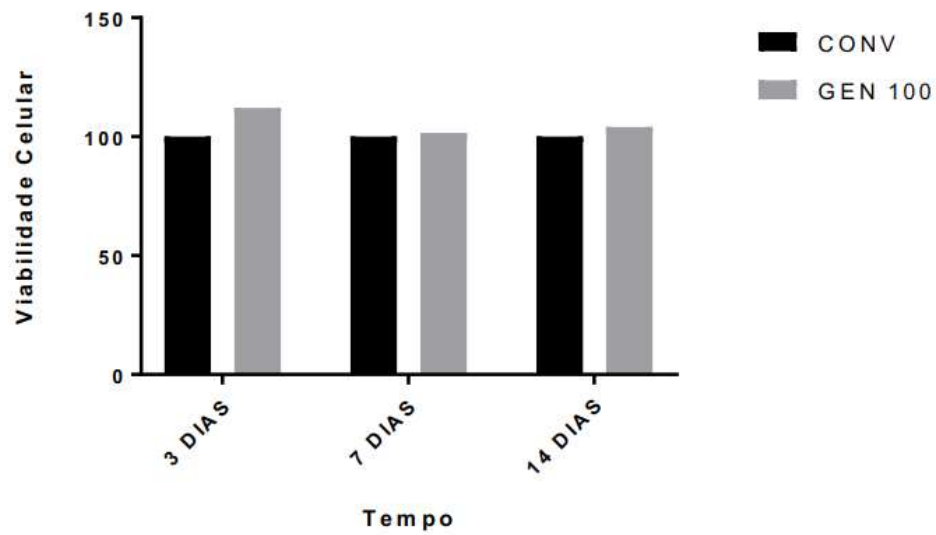
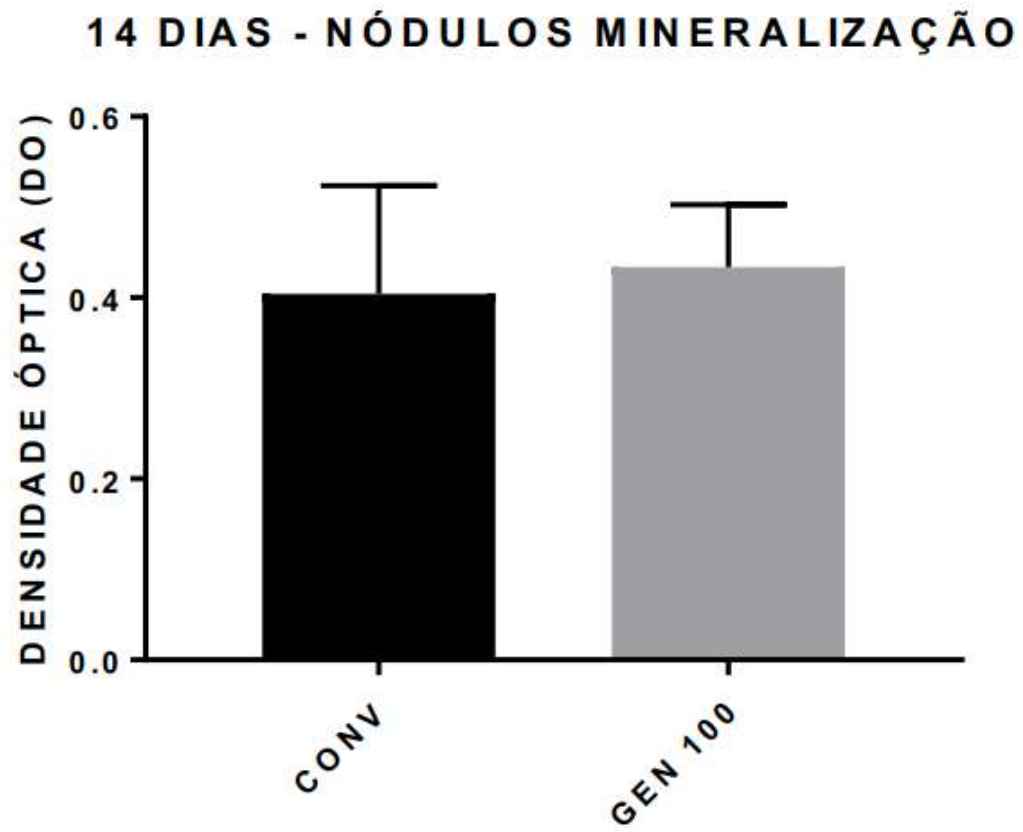


FIGURA 1B

**FIGURA 2**

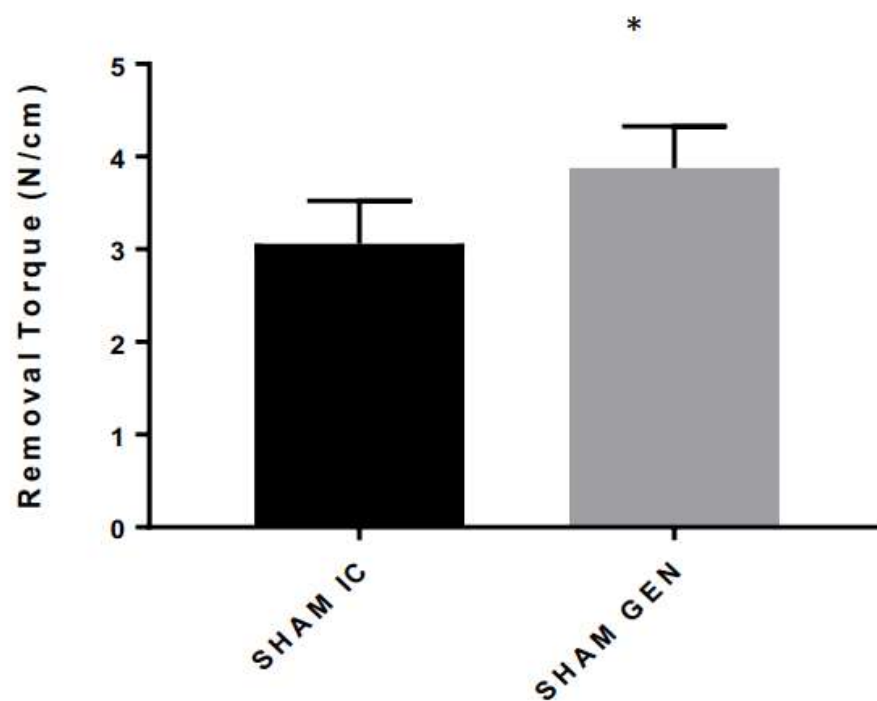


FIGURA 3

RESUMO

FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM GENISTEINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *LAYER BY LAYER* COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE PREPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

O presente pedido de patente de invenção consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes ósseointegráveis), utilizando uma molécula bioativa que promove respostas favoráveis ao processo de reparo perimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na Genisteína, um agonista da via MAPK, que atua sinalizando respostas celulares relacionadas a diferenciação osteoblástica e melhorando o aporte sanguíneo local, de forma a contribuir de forma positiva ao processo de reparo perimplantar. A ideia é ativar as respostas celulares no leito receptor do implante ósseointegrável, contribuindo para que haja uma melhora no processo de formação do tecido ósseo perimplantar, possibilitando uma melhora na qualidade e na quantidade do tecido ósseo operacional.