



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

JADISON JUNIO CONFORTE

**Avaliação do processo de reparo peri implantar do PEEK com
potencial de substituição do titânio para implantes dentários**

**Araçatuba - SP
2023**

JADISON JUNIO CONFORTE

**Avaliação do processo de reparo peri implantar do PEEK com
potencial de substituição do titânio para implantes dentários**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração em Implantodontia

Orientador: Prof. Titular. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientadora: Profa Associada. Mariza Akemi Matsumoto

**Araçatuba - SP
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Conforte, Jadison Junio.

C748a Avaliação da dinâmica do reparo ósseo peri implantar em
materiais com potencial de substituição do titânio para implantes
dentários/ Jadison Junio Conforte. – Araçatuba, 2023
53 f. : il. ; tab.

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

Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

1. Implantes dentários 2. Titânio 3. Osseointegração I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho

A minha família, meus pais Milton Conforte e Maria Fatima Rezende Conforte e meu irmão Vinicius Conforte por serem meus maiores exemplos de força, respeito e dedicação. Obrigado por estarem presentes em todos os momentos e por não medirem esforços para que meus sonhos se realizem. Essa conquista é nossa! Minha eterna gratidão e amor por vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Que sempre está ao meu lado para me guiar e amparar. Se cheguei até aqui, foi graças as bênçãos concedidas pelo senhor.

Aos meus espíritos protetores

Por sempre se manterem vigilantes nas situações as quais vivencio, estando vigilantes e receptivos na ajuda de dificuldades as quais passei e que poderia passar, mas que sempre puderam atenuar estes percalços da vida terrestre.

A minha noiva

A Ana Cláudia Rodrigues da Silva, por sempre me apoiar nas minhas tomadas de decisão; pela ajuda nos momentos que mais precisei; por me tranquilizar e ensinar a superar as dificuldades as quais a vida impõe. Tenho muito apreço, respeito, admiração, carinho por você e isso só reforça mais o nosso relacionamento. Tenho muito orgulho por conviver contigo todo este tempo. Eu te amo!

Aos mestres

Meu orientador Wirley Gonçalves Assunção, que me aceitou como seu orientado no mestrado e estendeu a oportunidade para que eu pudesse continuar no doutorado. Um exemplo de profissional clínico a qual tenho muita admiração e professor. Agradeço a confiança que o senhor depositou em mim. Na Pós-Graduação vivemos uma mistura de sentimentos e emoções, ainda mais quando fazemos concomitante atividade profissionais no doutorado, o senhor sempre foi compreensivo durante a minha permanência na pós graduação. Agradeço eternamente por me conceder a liberdade para que eu pudesse desenvolver outras atividades profissionais que não fosse apenas ficar confinado em um laboratório desenvolvendo o meu projeto, pois isto fez com que eu tivesse desenvolvimento clínico e manutenção de minha saúde mental neste período.

Minha Coorientadora, Mariza Akemi Matsumoto tiver a oportunidade de conhecê-la através de minha noiva, à época a sua orientada de iniciação científica, por ter concedido a sua orientação e ter me auxiliado em desenvolver este trabalho que tanto gerou dificuldade em virtude da instabilidade do material que se apresentou no leito ósseo. A senhora sempre foi receptiva, benevolente, companheira e atenta neste momento. Sempre terei eterna gratidão por tudo que a senhora poder me ajudar neste momento.

Ao meu professor Edilson Ervolino que pelo companheiro, bondade e atenção que pode sempre me ajudar, até mesmo neste momento, ainda mais motivo pela proximidade de trabalho que o senhor tem com professora Mariza.

Ao meu professor Juliano Milanezi de Almeida agradeço por sempre me proporcionar grandes aprendizados na pós graduação na clínica de periodontia. Serei muito grato por conceder espaço no biotério da periodontia em um momento a qual a instituição tinha todos os biotérios lotados e sem poder receber animais para condução de pesquisas em um momento em que o meu tempo de execução estava limitado. Sou muito grato por ter me ajudado nesta ocasião.

À Eloi Dezan Junior por ter concedido as dependências do Departamento de Odontologia Preventiva e Restaurado para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Agradeço pela amizade que firmamos neste período e por todo o respeito e empenho que o senhor presta para orientar a minha noiva.

Aos professores Adriana Cristina Zavanelli, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Avila Souza os senhores e senhoras são grandes inspirações na docência, na pesquisa e como clínicos. Agradeço pelos conselhos, pelas aulas, pelas considerações, participação direta ou indireta e por contribuírem para o meu crescimento na pós-graduação. Muito admiração por todos vocês!

Aos amigos

Aos meus amigos da graduação e pós-graduação para a vida Luan Felipe Toro, Henrique Rinaldi Matheus, Ana Maria Vasquez, Vinicius Ganzaroli, Gestter Lattari Tessarini por terem me dado o respaldo necessário para que este trabalho pudesse surgir. Agradeço de coração por poderem compartilhar as angústias, frustrações e conquistas na condução deste experimento.

Aos meus amigos de trabalho, Karina Camara, Fábio Batista, Roberta Mile Rossi, Marina Módulo, Samuel Fernandez que sempre estiveram me motivando para que eu pudesse chegar neste momento da finalização deste trabalho.

Aos funcionários

Agradeço a toda equipe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, em especial ao Jander e Marco por serem sempre muito solícitos e pacientes. Às funcionárias da Seção de pós-graduação, Cristiane, Eduardo e Camila de Abreu, pela paciência e ajuda com os prazos e documentações, obrigado por tudo.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Na pessoa dos professores: Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem, digníssimo Diretor e Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra, digníssimo Vice-Diretor.

Ao apoio da empresa,

DSP Biomedical por projetar, produzir e fornecer os implantes usados nesta pesquisa. Sabemos da dificuldade que foi para projetar estes espécimes, ainda mais em um momento conturbado a qual a sociedade mundial vivia, durante a pandemia de COVID-19.

Minha eterna gratidão.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin

CONFORTE, J. J. **Avaliação do processo de reparo peri implantar do PEEK com potencial de substituição do titânio para implantes dentários**. 2023. 54 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O poli-éter-éter-cetona (PEEK) é um polímero sintético orgânico, termoplástico semi cristalino poli acromático, biocompatível, radiolúcido e com boas propriedades mecânicas que vem sendo testado para que possa ter sua aplicação clínica, haja que o PEEK é o material usado em impressoras 3D. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a resposta do reparo ósseo na interface da superfície de implantes PEEK em comparação aos implantes dentários à base de titânio. Utilizou-se 32 ratos (*Rattus albinus*, Wistar), com 20 semanas de vida, divididos aleatoriamente em dois grupos com dois períodos por grupo, a saber: Ti-6Al-4V-28D; Ti-6Al-4V-42D; PEEK-28D; PEEK-42D. Os animais passaram pelo procedimento de instalação de implante em tíbia direita e ao término de cada período experimental, foram eutanasiados. Na sequência, as amostras foram escaneadas em microtomografia computadorizada (Micro-CT). Após, foram descalcificadas em EDTA e processadas para análises histológicas (Hematoxilina e Eosina) e Imunoistoquímica (BMP2 e BMP7, OCN e TRAP). Os dados obtidos na Micro-CT foram submetidos ao software SigmaPlot 12.0, com teste de normalidade Shapiro Wilk e analisados por *t test*, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para as análises imunoistoquímicas, adotou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn ($p < 0,05$). O grupo Ti-6Al-4V-28D apresentou maior volume ósseo em comparação ao PEEK-28D ($p = 0.023$), assim como na análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) ($p=0.041$). Em contrapartida, o grupo PEEK-42D apresentou maior separação de trabéculas (Tb.Sp) comparado ao Ti-6Al-4V-42D ($p = 0.016$). Na análise histopatológica o grupo PEEK apresentou-se irregular, sem a preservação da anatomia da superfície do corpo dos implantes e com tecido ósseo descontínuo, enquanto o Ti-6Al-4V apresentou tecido ósseo com aspectos de normalidade. Na análise imunoistoquímica o grupo Ti-6Al-4V-28D apresentou maior imunomarcagem de proteínas osteoindutoras (BMP2 e BMP7) e OCN ($p < 0,05$). Concluiu-se que o implante Ti-6Al-4V apresentou melhor desempenho no processo de reparo comparado ao PEEK.

Palavras-chave: Implantes dentários. Titânio. Osseointegração.

CONFORTE, J. J. **Evaluation of the PEEK peri-implant repair process with the potential to replace titanium for dental implants.** 2023. 54 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Poly-ether-ether-ketone (PEEK) is an organic synthetic polymer, semi-crystalline thermoplastic poly achromatic, biocompatible, radiolucent and with good mechanical properties that has been tested so that it can have its clinical application, given that PEEK is the material used in 3D printers. The objective of work was to evaluate in vivo the bone repair response at the surface interface of PEEK implants in comparison to titanium-based dental implants. We used 32 rats (*Rattus albinus*, Wistar), aged 20 weeks, randomly divided into two groups with periods per groups, namely: Ti-6Al-4V-28D; Ti-6Al-4V-42D; PEEK-28D; PEEK-42D. The animals underwent the implant installation procedure in the right tibia and at the end of each experimental period, they were euthanized. Next, the samples were scanned using microcomputed tomography (Micro-CT). Afterwards, they were decalcified in EDTA and processed for histological analysis (Hematoxylin and Eosin) and immunohistochemistry (BMP2 and BMP7, OCN and TRAP). The data obtained from Micro-CT were submitted to SigmaPlot 12.0 software, with Shapiro Wilk normality test and analyzed by test, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). For immunohistochemical analyses, the Kruskal-Wallis test was adopted, followed by Dunn's post hoc test ($p < 0.05$). The Ti-6Al-4V-28D group showed greater bone volume compared to PEEK-28D ($p = 0.023$), as well as in the analysis of trabecular thickness (Tb.Th) ($p = 0.041$). In contrast, the PEEK-42D group showed greater trabecular separation (Tb.Sp) compared to Ti-6Al-4V-42D ($p = 0.016$). In histopathological analysis, the PEEK group appeared irregular, without preserving the anatomy of the surface of the implant body and with discontinuous bone tissue, while the Ti-6Al-4V group presented bone tissue with normal aspects. In the immunohistochemical analysis, the Ti-6Al-4V-28D group showed greater immunostaining of osteoinductive proteins (BMP2 and BMP7) and OCN ($p < 0.05$). It was concluded that the Ti-6Al-4V implant presented better performance in the repair processor compared to PEEK.

Keywords: Dental implants. Titanium. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração das etapas cirúrgicas para a instalação de implantes em 22
tíbia lado direito. A) tricotomia. B) incisão com lâmina 15c linear. C)
deslocamento de periósteo. D) defeito ósseo da fresagem. E)
implante instalado. F) sutura simples interrompida realizada com fio
de nylon 6.0
- Figura 2 - Região de observação de interesse. O retângulo vermelho em 1 23
representa o ROI determinado para as análises microtomográficas.
O quadrado vermelho em 2 representa o ROI determinado para as
análises histológicas. O quadrado vermelho em 3 representa o ROI
determinado para as análises imunoistoquímicas. CO - osso
cortical. EP - osso esponjoso.
- Figura 3 - Ilustração do implante em tíbia direita no plano sagital. A) PEEK- 23
28d. B) Ti-6Al-4V-28d. C) PEEK- 42d. D) Ti-6Al-4V- 42d. O
retângulo vermelho representa o ROI determinado para as análises
microtomográfica
- Figura 4 - A e B) 28 dias – Em A observa-se superfície da área previamente 29
ocupada pelo implante de titânio (Ti) recoberta por tecido ósseo
maduro com focos de remodelação (#) com discreta atividade
osteoclástica (seta preta), recoberto por células de revestimento
(seta vermelha). A medula óssea vermelha (**) encontrava-se
infiltrada por leucócitos mononucleares. Já os implantes PEEK (B)
exibiam recobrimento descontínuo e irregular de tecido ósseo
maduro (*) entremeado por tecido conjuntivo (seta azul). C e D) 42
dias – Neste período, os implantes de titânio (Ti) estavam
recobertos por tecido ósseo maduro de aspecto lamelar (*), com
focos de remodelação (#). Os implantes PEEK exibiram tecido
ósseo maduro (*) recobertos por células de revestimento (seta
vermelha) (HE; aumento original 20x)
- Figura 5 - BMP-2 A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação 34
e moderada imunomarcção); B (PEEK 42 dias – com ossos mais

maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão) - BMP-7 A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão). – Osteocalcina A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão) TRAP A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada à baixa imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e moderada à baixa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e baixa imunomarcacão). Aumento de 40x.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados estatísticos do parâmetro BV/TV. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos considerando o mesmo período ($p < 0,05$) 28
- Tabela 2 - Resultados estatísticos dos parâmetros Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos considerando o mesmo período ($p < 0,05$) 29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Análise da imunomarcção para BMP2 em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais	31
Gráfico 2-	Análise da imunomarcção para BMP7 em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais.	32
Gráfico 3-	Análise da imunomarcção para OCN em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais.	33
Gráfico 4-	Análise da imunomarcção para TRAP em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ti: titânio

HA: hidroxiapatita

PEEK: poli-éter-éter-cetona

Micro-Ct: microtomografia

BMP-2: proteína morfogenética 2

BMP-7: proteína morfogenética 7

OCN: osteocalcina

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

CTMs: célula tronco mesenquimais

Ti-6Al-4V: titânio-6-alumínio-4-vanádio

BV/TV - %: fração de volume ósseo

Tb.N: número de trabéculas

Tb.Th: espessura de trabéculas

Tb.Sp: separação de trabéculas

mg/kg: miligrama por quilograma

Ø: diâmetro

IM: intra muscular

ml/kg: mililitro por quilograma

pH: potencial de hidrogênio

kv: Kilovolt

µA: miliampere

ROI: região de observação de interesse

SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
2 Objetivo	19
2.1 Objetivos específicos	19
3 Material e Métodos.....	20
3.1 Animais	20
3.2 Implantes.....	20
3.3 Divisão de Grupos	20
3.4 Procedimento cirúrgico de instalação dos implantes	21
3.5 Eutanásia e obtenção das amostras.....	22
3.6 Região de Observação de Interesse - ROI	23
3.7 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	24
3.8 Processamento histológico e coloração de Hematoxilina e Eosina	25
3.9 Imunoistoquímica.....	25
3.10 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Observações laboratoriais.....	27
4.2 Análises de MicroCT	27
4.3 Análise histológica.....	29
4.5 Análise imunoistoquímica	30
4.5.1 BMP2 e BMP7.....	30
4.5.2 OCN	32
4.5.3 TRAP	33
5 Discussão	36
6 Conclusão	41
Referências.....	42
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são bem difundidos na clínica odontológica para substituição de elementos dentários de indivíduo total ou parcialmente desdentados, sendo considerados o modelo ouro para a reabilitação oral devido à sua previsibilidade clínica.^{1,2} A aplicação dos implantes dentários é alcançada pela variedade de materiais e ligas metálicas empregadas em sua fabricação, bem como o desenvolvimento de superfícies que aprimoram a qualidade dos materiais empregados.³ Esses materiais em contato com o tecido ósseo promovem a osseointegração, permitindo uma conexão estrutural e funcional direta entre osso e superfície de implante.⁴

A liga metálica mais utilizada para implante dentário é o titânio (Ti), considerado padrão ouro.^{5,6} O titânio apresenta alta resistência mecânica associado a outros metais, além de biocompatibilidade com os tecidos corporais, tornando-se um dispositivo com aplicabilidade médica e odontológica.^{7,8}

Para ocorrer formação óssea peri-implantar, alguns fatores devem ser levados em consideração, como os protocolos cirúrgicos de inserção do implante, os tratamentos de superfície e as condições orgânicas do indivíduo.^{9,10} De fato, o protocolo cirúrgico deve ser preciso e seguro para evitar o aquecimento durante o processo de fresagem e a compressão excessiva na cortical óssea durante a inserção de implantes dentários, evitando danos irreversíveis, como a apoptose celular e/ou a tensão e a necrose óssea.^{10,11}

As modificações das superfícies dos implantes de titânio, seja pela técnica de adição (superfície com saliência promovida por adição de plasma spray de titânio ou hidroxiapatita – HA), seja pela técnica de subtração (poros sobre a superfície),¹²⁻¹⁴ permite melhorias nas propriedades de rugosidade, molhabilidade, energia superficial e alterações químicas.¹⁵⁻¹⁷ Desse modo, a modificação de superfície e a inserção do implante corretamente permitirá uma adaptação fisiológica do tecido ósseo e uma resposta imuno-inflamatória menos exacerbada, favorecendo o processo de osseointegração.

Em relação ao local receptor dos implantes dentários, algumas condições podem influenciar na estética e funcionalidade, como o biótipo gengival, espessura da cortical vestibular e região localizada na arcada dentária. Estas se não adequadas

podem favorecer a exposição do metal do implante de titânio, causando alterações de cor no tecido mole.¹⁸ Com isso, pensando-se em uma possível exposição do implante dentário, alguns materiais livres de metais foram desenvolvidos como alternativa para os implantes de titânio afim de manter a relação entre estética branca e vermelha, como o poli-éter-éter-cetona (PEEK).^{2,3,19}

O PEEK é um polímero orgânico, termoplástico semicristalino poli acromático, biocompatível, radiolúcido e com boas propriedades mecânicas.²⁰⁻²² Possui módulo de Young na forma pura de 3,6 Pascal, reforçado com carbono de 18 Pascal e fibra de vidro de 12 Pascal.²⁰ Além disso, possui baixo peso, estabilidade de cor, baixo potencial alergênico e ausência de corrosão.^{23,24} O material tem sido utilizado como material de implante na coluna vertebral, fixação de fraturas e cirurgia bucomaxilofacial.^{22,25,26} Sua utilização como substituto de implantes dentários de titânio ainda é discutida na literatura, por apresentar inércia química e biológica ao fixar ao tecido ósseo.²⁷ Na odontologia, o PEEK tem sido utilizado na construção de próteses fixas e removíveis fresadas em CAD/CAM.²⁸

O contato do epitélio oral com a superfície deste material favorece viabilidade, adesão, migração e proliferação de queratinócitos.²⁹ Alguns estudos *in vitro* evidenciaram que o material apresentou colonização bacteriana reduzida sobre a superfície quando comparado ao titânio puro em contato com tecidos moles, além disso, é livre de metal, não sofrendo corrosão, impedindo o desenvolvimento de peri implantite.³⁰⁻³²

Assim como os implantes de titânio, o PEEK também pode sofrer alterações de superfície para melhorar a interação com o tecido ósseo, como o jateamento com areia, adição de hidroxiapatita (HA), revestimento com óxido de titânio.^{33,34} O PEEK com o tratamento de superfície de jateamento de areia demonstrou excelentes propriedades biocompatíveis e osteogênicas com o leito ósseo.³³ Já com o tratamento de superfície com HA apresentou maior resistência ao cisalhamento nas análises de 6 a 12 semanas *in vivo* em comparação ao PEEK sem tratamento.³⁵ Esse padrão se repete na análise histomorfométrica, o qual a porcentagem osso/implante foi maior no grupo com tratamento.³⁵

A fim de investigar o contato osso/implante do PEEK, análises histológicas e micro tomográficas (Micro-CT) tem sido utilizadas.³⁶⁻³⁸ A análise de Micro-CT permite

realizar uma varredura de toda a região de interesse do espécime, facilitando a obtenção do volume ósseo ao redor do implante com exatidão.^{36,37} O uso do modelo animal utilizando análises de Micro-CT demonstrou possuir alta precisão das medidas ósseas peri implantares, cuja confiabilidade dos dados no diagnóstico na detecção de perda óssea peri implantar é relatada como alta e eficaz.³⁸ Por outro lado, estudos reforçam que é preciso a avaliação histológica do local para trazer maior confiabilidade.³⁹

Alguns imunomarcadores têm sido utilizados como moléculas-chave envolvidas na regulação da formação óssea, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), OCN e TRAP.⁴⁰⁻⁴² Durante o processo de formação óssea, células-tronco mesenquimais (CTMs) são recrutadas para diferenciar-se em osteoblastos. O BMP2 quando liberado na matriz óssea durante a reabsorção pelos osteoclastos, promove a diferenciação das CTMs em osteoblastos.⁴³ Também associada ao processo de osteoblastogênese, a osteocalcina (OCN) é responsável pela atividade das células da linhagem osteoblástica⁴⁴ e ao processo de osteoclastogênese, a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é um potente evidenciador de osteoclastos.^{41,42}

Ainda que os trabalhos relatem que o PEEK possui potencial para substituir os implantes dentários de titânio, é preciso cautela.²⁰ Investigações são necessárias para entender a interação entre a superfície do material PEEK e o tecido ósseo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* o reparo ósseo mineralizado na interface da superfície de implantes PEEK por meio da análise de Micro-CT, histopatológica e imunoistoquímica.

2 OBJETIVO

Avaliar a qualidade óssea por meio de parâmetros histopatológicos, imunoistoquímicos e microtomográficos na região peri-implantar em tíbias de ratos que receberam implantes de PEEK, comparando-os aos implantes de liga de titânio (Ti-6Al-4V).

2.1 Objetivos específicos

Nas regiões de observação de interesse pré-estabelecidas da interface implante e tecido ósseo, fez-se: análises microtomográficas de parâmetros para o tecido ósseo trabeculado, como fração de volume ósseo (BV/TV - %), bem como para parâmetros morfológicos como número de trabéculas (Tb.N – pixel), espessura de trabéculas (Tb.Th - pixel) e separação de trabéculas (Tb.Sp - pixel); análise histopatológica dos tecidos peri-implantares e adjacentes, e; análise imunoistoquímica direcionada para a detecção dos seguintes biomarcadores: proteína morfogenética óssea 2/7 (BMP2 e 7, *Bone morphogenetic protein 2 e 7*); osteocalcina (OCN, *Osteocalcin*), envolvidos com a osteoblastogênese e atividade das células da linhagem osteoblástica, e; fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *Tartrate-resistant acid phosphatase*), um evidenciador de osteoclastos.

As análises foram para determinar como ocorreu o reparo do tecido ósseo em contato com a superfície do poli-éter-éter-cetona e o titânio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus albinus*, Wistar), com 20 semanas de vida, pesando entre 300 e 400g cada. Os animais foram alocados no Biotério de Experimentação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOA-UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$. Os animais foram acomodados em gaiolas, com no máximo de 4 animais, acesso a comida e a água “*ad libitum*” durante o tempo experimental. Para este estudo foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados e assim evitar o sofrimento dos animais em estudos.

Os procedimentos de manipulação experimental foram de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide to the care and use of experimental animals*” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP, sob protocolo FOA Nº 424-2020 (Anexo A).

3.2 Implantes

Para o presente estudo, foram utilizados implante à base de liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e poli-éter-éter-cetona (PEEK) ambos disponibilizados pela empresa DSP Biomedical (DSP Biomedical, Campo Largo, Paraná, Brasil), ambos com 2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento, de conexão morse, superfície texturizada com jateamento seguido de duplo ataque ácido e esterilizados por meio de radiação ultravioleta. O PEEK apresentou geometria trapezoidal e o Ti-6Al-4V espira triangulares. A diferença se deu em detrimento da dificuldade de manufatura da empresa de implante para confecção dos implantes PEEK com uma geometria de espiras semelhantes ao Ti-6Al-4V. Ao todo foram usados 32 implantes, dos quais 16 foram PEEK e 16 de titânio.

3.3 Divisão de Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de implante utilizado, Ti-6Al-4V e PEEK, subdivididos em dois períodos experimentais, a saber: (Ti-6Al-4V-28D), (Ti-6Al-4V-42D), (PEEK-28D) e (PEEK-42D) de pós-operatórios. Cada grupo teve por período 8 animais ($n = 8$).

3.4 Procedimento cirúrgico de instalação dos implantes

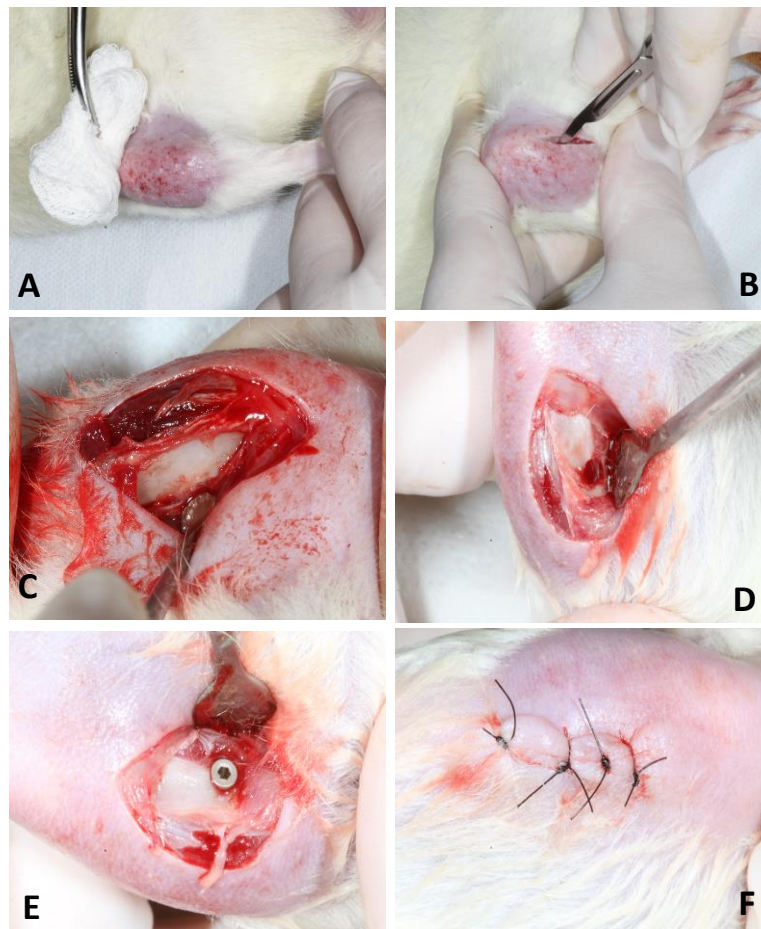
Para o procedimento cirúrgico de instalação seguiu-se o protocolo experimental proposto por Al-Subaiae et al., 2016 e Marinho et al., 2003.^{45,46} Antes do procedimento cirúrgico os animais tiveram restrição alimentar de 12 horas e 1 hora antes da cirurgia tiveram a restrição de água.

Os animais foram anestesiados via intramuscular com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil), na proporção de 1:1, a qual respeitou o peso corporal de cada animal, a fim de promover uma sedação profunda e anestesia. Em seguida, foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e assepsia com clorexidina a 2,0% por 30 segundos. Após, foi confeccionado incisão linear com lâmina 15C adaptada em cabo de bisturi 3 (Swann Morton® – Sheffiled – England) de 15 milímetros de extensão. Na sequência, foi realizado os afastamentos dos tecidos (epitelial, conjuntivo, muscular e periosteal) para a exposição do tecido ósseo subjacente (Figura 1).

Para a fresagem do leito a receber o implante, fez-se um defeito com broca piloto de Ø 0,50 mm, seguido de escalonamento de brocas (Ø 1,2 e 2,0 mm) montada em contra-ângulo 20:1 redutor de velocidade (NSK®, Neodent, Curitiba, Brasil) acionado por motor elétrico (NSK®, Neodent, Curitiba, Brasil) a uma rotação de 600 rpm sob irrigação constante de solução de cloreto de sódio 0,9% impulsionado pela bomba peristáltica (velocidade 3), para evitar aquecimento ósseo e comprometer o processo de reparo. Com auxílio de uma chave digital 1,2 milímetro os implantes foram conectados e fixados em cada loja cirúrgica. Após instalação e estabilização dos implantes, o tecido foi suturado com fios de Nylon, 6.0 (Shalon Medical, São Luis M. Belos – GO – Brasil) (Figura 1). Duas horas após o procedimento cirúrgico os animais tiveram acesso a comida e a água “*ad libitum*”.

Para analgesia utilizou-se a dipirona sódica via intramuscular no pós-operatório (200mg/Kg Analgex V®, Agener União Saúde Animal - SP – Brasil) com aplicação de segunda dose 6 horas após a primeira dose. Os animais receberam Penicilina via IM (0,5 ml/kg de peso, Pentabiótico® Veterinário Pequeno Porte - Font Dodge - Campinas – Brasil) no pós-operatório imediato e uma segunda dose 48 horas após.

Figura 1- Ilustração das etapas cirúrgicas para a instalação de implantes em tíbia lado direito. A) tricotomia. B) incisão com lâmina 15c linear. C) deslocamento de periósteo. D) loja cirúrgica para instalação do implante. E) implante instalado. F) sutura simples interrompida realizada com fio de nylon 6.0



Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

3.5 Eutanásia e obtenção das amostras

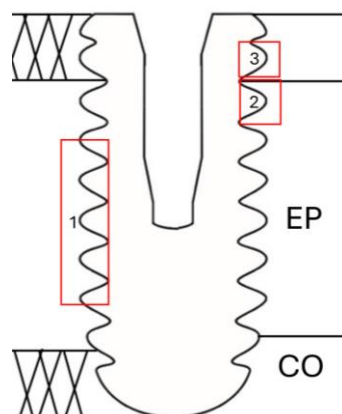
Os animais foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica, via intraperitoneal. O anestésico utilizado foi o cloridrato de cetamina (80 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil), na proporção de 1:1 e com dobro da aplicação a qual caracteriza

sobredosagem. As tíbias direitas foram removidas e fixadas em solução formaldeído a 4%, em pH neutro por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e acondicionadas em álcool 70° a fim de serem submetidas ao escaneamento utilizando o sistema Micro-CT (Bruker SkyScan 1272, Aartselaar, Bélgica).

3.6 Região de Observação de Interesse - ROI

Este trabalho contou com três regiões de observação de interesse (ROI) para a microtomografia (1), histológica (2) e imunoistoquímica (3) (Figura 02). Conforme figura 02, o ROI (1) foi padronizado para microtomografia, pois buscou-se saber se houve formação óssea na região medular, haja vista que a remoção dos implantes para depois fazer o processamento histológico pode causar um desarranjo do tecido local e dando um dado falso que não teve formação óssea na parte medular. Na ROI (2) foi para o histológico, a qual se situou nos dois primeiros espaços entre as espiras do implante no tecido ósseo esponjoso da tíbia. No ROI (3) para o imunoistoquímico consistiu neste local em detrimento dos sucessivos banhos para a imunoistoquímica ter promovido um desarranjo do tecido de PEEK, haja vista que eles eram preenchidos por tecido conjuntivo desorganizados na região medular.

Figura 2 – Região de observação de interesse. O retângulo vermelho em 1 representa o ROI determinado para as análises microtomográficas. O quadrado vermelho em 2 representa o ROI determinado para as análises histológicas. O quadrado vermelho em 3 representa o ROI determinado para as análises imunoistoquímicas. CO - osso cortical. EP - osso esponjoso.

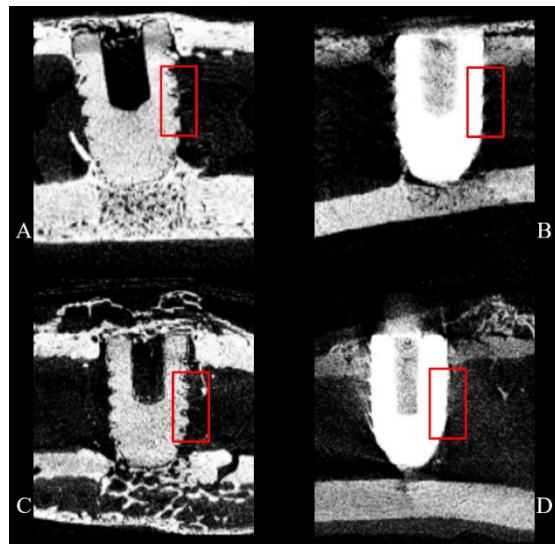


Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

3.7 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

As amostras foram digitalizadas com as seguintes configurações: 80 kV, 125 μ A, 8,99 por imagem de pixel. Um filtro de alumínio de 1,0 mm foi usado durante as varreduras. Após o escaneamento, as imagens foram reconstruídas no software NRecon (SkyScan), alinhadas no Dataviewer (SkyScan), analisadas no CTAnalyser (SkyScan). Uma região de interesse (ROI) foi padronizada na região central do implante, entre as corticais ósseas. A área envolvia as espiras do implante e o tecido ósseo ao redor (Figura 3). Para o tecido ósseo trabeculado foram quantificados os seguintes parâmetros: fração de volume ósseo (BV/TV - %), bem como para parâmetros morfológicos como número de trabéculas (Tb.N – pixel), espessura (Tb.Th – pixel) e separação de trabéculas (Tb.Sp – pixel)⁴⁷.

Figura 3 - Ilustração do implante em tíbia direita no plano sagital. A) PEEK- 28d. B) Ti-6Al-4V-28d. C) PEEK- 42d. D) Ti-6Al-4V- 42d. O retângulo vermelho representa o ROI determinado para as análises microtomográficas



Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

3.8 Processamento histológico e coloração de Hematoxilina e Eosina

Após o escaneamento em Micro-CT, os espécimes foram lavados em água corrente por 12 horas e descalcificados em EDTA (Sigma-Aldrich) tamponado a 10% por 50 dias, lavados novamente em água corrente por 12 horas, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol. Nesse momento, os implantes foram removidos cuidadosamente com auxílio de uma chave digital de 1,2 mm. Na sequência, as amostras foram incluídas em parafina. Os espécimes foram então seccionados em micrótomo com 5µm de espessura, seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja anteriormente ocupada pelo implante. Os cortes seriados correspondentes à porção central de tal loja foram devidamente coletados em lâminas de vidro convencionais para microscopia (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais) e em lâminas de vidro silanizadas. Na sequência, cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina.

O ROI para as análises microscópicas consistiu na região compreendida pelos dois primeiros espaços entre as espiras do implante que estejam situados no tecido ósseo esponjoso da tíbia.^{48,49,50} Na análise descritiva além dos tecidos compreendidos na ROI previamente descrita, foram também observadas as características microscópicas dos demais tecidos adjacentes.

3.9 Imunoistoquímica

Para a avaliação do tecido ósseo, foram utilizados os anticorpos primários anti-BMP2/7 do rato produzido em coelho (SC-9003; Santa Cruz Biotechnology Inc., Carpinteria, CA, EUA), anti-OCN do rato produzido em cabra (SC-18319; Santa Cruz Biotechnology Inc.) e anti-TRAP do rato produzido em cabra (SC-30833; Santa Cruz Biotechnology Inc) nos tecidos peri-implantares, as secções histológicas coletadas em lâminas de vidro silanizadas para microscopia foram submetidas à reação imunoistoquímica pela técnica da imunoperoxidase indireta. Todos os anticorpos foram preparados na concentração de 1:100, em diluente específico (S3022; *Antibody Diluent with Background Reducing Components*, Dako North America Inc., Carpinteria/CA, EUA). Em seguida, as secções histológicas destinadas à detecção de BMP2/7 foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário biotinilado

anticoelho produzido em cabra (K0675; *Biotinylated Link*, Dako North America Inc.) diluído na concentração de 1:200 e o OCN e a TRAP em solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (ZB0923; *Biotinylated anti-goat IgG (H+L)*, Vector Laboratories Inc., Burlingame/CA, EUA) diluído na concentração de 1:200, durante 90 minutos. Na sequência, ambas foram tratadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase (K0675; *Streptavidin- HRP*, Dako North America Inc.), também durante 90 minutos. A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'- diaminobenzidina (K3468; *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, Dako North America Inc.). Para a contracoloração, os espécimes foram então lavados em água, imersos em hematoxilina de Harris para BMP2/7, OCN e TRAP. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água para a retirada do excesso de corantes, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e recobertas pelo meio de montagem (PermOUNT®, Fisher Scientific Company LLC.) protegidas com lâminas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).⁵¹

O ROI para as análises microscópicas consistiu na região compreendida na segunda espira localizada na cortical. Nesta região foi efetuada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcação para os imunomarcadores estudados, o qual: ESCORE 0, imunomarcação nula, ausência de células imunorreativas e ausência de imunomarcação na matriz extracelular; ESCORE 1, baixo padrão de imunomarcação, aproximadamente 20% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular; ESCORE 2, aproximadamente 40% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular, ESCORE 3, aproximadamente 60% das células imunorreativas e moderada ou forte marcação na matriz extracelular

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do software SigmaPlot 12.0 por um único operador calibrado de maneira cega. Na sequência foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e analisados por *t test*, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para os parâmetros avaliados nas análises imunoistoquímicas, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Observações laboratoriais

Durante o procedimento cirúrgico não foi constatado sinais de fratura na região de interesse, seja durante a fresagem ou na inserção do implante. Não houve mortes de animais. No momento da eutanásia, foram observados macroscopicamente a tíbia com o implante fixado sem a presença de qualquer calo ósseo, trinca ou presença de processo infeccioso no local.

Na instalação dos implantes PEEK houve maior dificuldade de inserção e estabilidade no leito cirúrgico, mesmo com o diâmetro da loja cirúrgica comportando o diâmetro do PEEK. Na remoção do PEEK após o período experimental, no processamento histológico apresentou maior dificuldade de remoção do implante PEEK do local instalado.

4.2 Análises de MicroCT

O grupo Ti-6Al-4V-28d ($79,784 \pm 5,065$) apresentou valor de BV/TV significativamente maior em comparação com o grupo PEEK 28d ($63,370 \pm 12,075$) ($p=0.023$). Aos 42 dias, o grupo Ti-6Al-4V- 42d ($72,585 \pm 14,999$) manteve maior BV/TV em comparação com o PEEK-42d ($67,741 \pm 18,8625$) e sem diferença estatística ($p = 0.682$) (Figura 2, Tabela 1).

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão referentes ao parâmetro BV/TV. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos considerando o mesmo período ($p < 0,05$)

GRUPOS	Tempo (dias)	Fração de volume ósseo
		BV/TV (%)
PEEK	28d	$63,37 \pm 12,075^a$
Ti-6Al-4V	28d	$79,784 \pm 5,065^b$
PEEK	42d	$67,741 \pm 18,625$
Ti-6Al-4V	42d	$72,585 \pm 14,199$

Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

No período de 28 dias, o grupo Ti-6Al-4V-28d ($14,436 \pm 2,549$) apresentou maior Tb.Th em comparação com o grupo PEEK-28d ($10,937 \pm 0,880$) ($p=0.041$). Em contrapartida, não houve diferenças significantes no período de 42 dias entre os grupos ($p=0.122$) (Tabela 2).

Na análise de Tb.N não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em ambos os períodos analisados (Tabela 2).

No período de 28 dias não houve diferenças significantes entre os grupos avaliados considerando Tb.Sp ($p = 0.056$). Por outro lado, no período de 42 dias, o grupo PEEK-42d ($7,008 \pm 2,198$) apresentou maior Tb.Sp ($p= 0.016$) em comparação ao grupo Ti-6Al-4V-42d ($3,039 \pm 0,943$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados estatísticos dos parâmetros Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos considerando o mesmo período ($p < 0,05$)

GRUPOS	Tempo (dias)	Análises Trabeculares		
		Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp
PEEK	28d	$10,937 \pm 0,880^a$	$0,0595 \pm 0,0185$	$5,863 \pm 2,1$
Ti-6Al-4V	28d	$14,436 \pm 2,549^b$	$0,0568 \pm 0,00928$	$3,180 \pm 0,858$
PEEK	42d	$13,717 \pm 2,588$	$0,0380 \pm 0,0292$	$7,008 \pm 2,198^a$
Ti-6Al-4V	42d	$10,048 \pm 3,145$	$0,0750 \pm 0,0104$	$3,039 \pm 0,943^b$

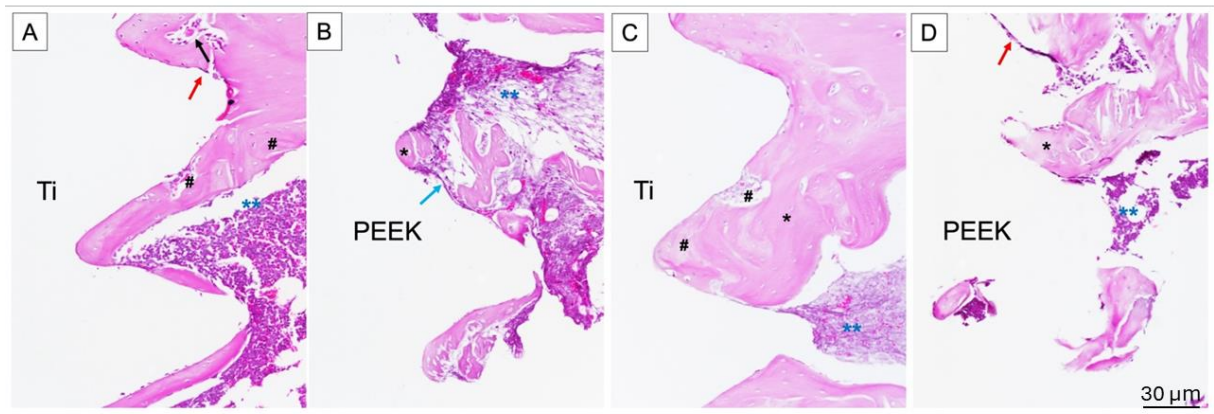
Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

4.3 Análise histológica

Após 28 dias da instalação dos implantes de titânio, analisou-se os tecidos que estavam em contato com a superfície previamente ocupada por eles. Observou-se tecido ósseo viável, rico em osteócitos e em processo de remodelação, caracterizado por áreas de matriz óssea irregular em meio à matriz lamelar e eventuais osteoclastos. A superfície externa das trabéculas ósseas apresentava-se irregularmente cobertas por células de revestimento. Por vezes era possível observar fina camada de tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário. Subjacente, notou-se medula óssea vermelha também predominantemente infiltrada por plasmócitos. Nos implantes PEEK, a superfície tecidual que estava em contato com os implantes apresentava-se irregular, sem a preservação da anatomia da superfície do corpo dos implantes. Notou-se tecido ósseo descontínuo, ora de aspecto lamelar recoberto por células de revestimento, ora cuja matriz mostrava-se irregular, permeado por tecido conjuntivo infiltrado por plasmócitos, predominantemente. O tecido medular subjacente também se encontrava infiltrado por leucócitos plasmócitos, em sua maioria (Figura 4 A e B).

Aos 42 dias, na superfície dos implantes de titânio, encontrava-se tecido ósseo predominantemente maduro de aspecto lamelar, com discretos focos de remodelação. O tecido medular subjacente exibia aspecto de normalidade. De modo diferente, nos implantes PEEK exibiam camada de tecido ósseo maduro lamelar delgada e irregular, recoberta por células de revestimento (Figura 4 C e D).

Figura 4 – A e B) 28 dias – Em A observa-se superfície da área previamente ocupada pelo implante de titânio (Ti) recoberta por tecido ósseo maduro com focos de remodelação (#) com discreta atividade osteoclástica (seta preta), recoberto por células de revestimento (seta vermelha). A medula óssea vermelha () encontrava-se infiltrada por leucócitos mononucleares. Já os implantes PEEK (B) exibiam recobrimento descontínuo e irregular de tecido ósseo maduro (*) entremeado por tecido conjuntivo (seta azul). C e D) 42 dias – Neste período, os implantes de titânio (Ti) estavam recobertos por tecido ósseo maduro de aspecto lamelar (*), com focos de remodelação (#). Os implantes PEEK exibiram tecido ósseo maduro (*) recobertos por células de revestimento (seta vermelha) (HE; aumento original 20x)**



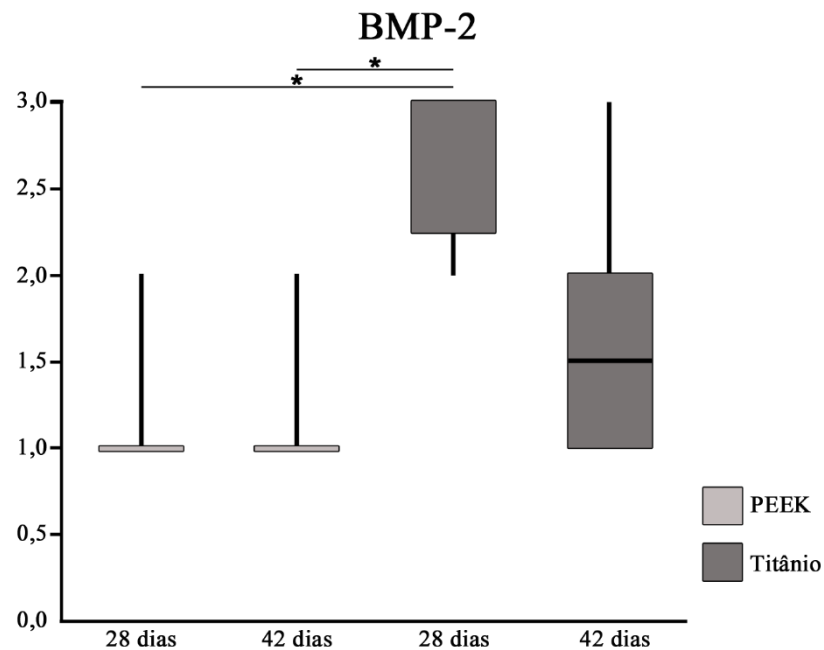
Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

4.5 Análise imunoistoquímica

4.5.1 BMP2 e BMP7

Na avaliação da imunomarcação de BMP2, o grupo PEEK-28d apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação), enquanto o Ti-6Al-4V-28d de 3 (2-3; prevaleceu um forte padrão de imunomarcação). Aos 42 dias, o PEEK apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação) e o grupo Ti-6Al-4V apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1,5 (1-3; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação) (Figura 4). Houve diferenças estatisticamente significantes entre o PEEK-28d em comparação ao grupo Ti-6Al-4V-28d, com maior imunomarcação para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p < 0,05$). O padrão se repete entre o grupo Ti-6Al-4V-28d e PEEK-42d, com maior imunomarcação para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p < 0,05$) (Gráfico 1).

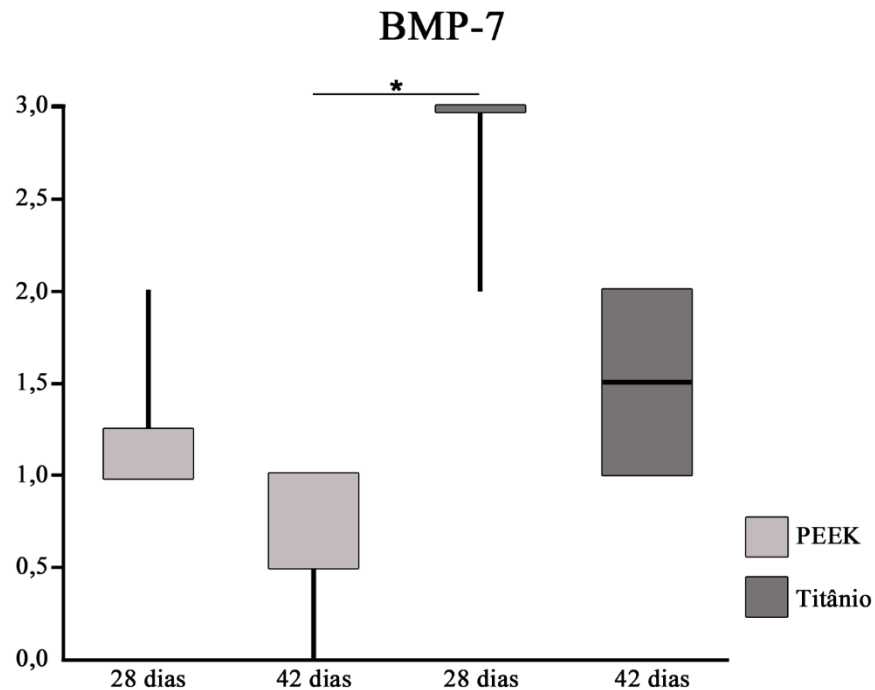
Gráfico 1 - Análise da imunomarcação para BMP2 em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais



Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

Na avaliação da imunomarcação de BMP7, o grupo PEEK-28d apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação), enquanto o Ti-6Al-4V-28d de 2 (2-3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcação). Aos 42 dias, o PEEK apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (0-1; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação) e o grupo Ti-6Al-4V apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1,5 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação) (Figura 4). Houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo Ti-6Al-4V-28d e PEEK-42d, com maior imunomarcação para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p < 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Análise da imunomarcação para BMP7 em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais

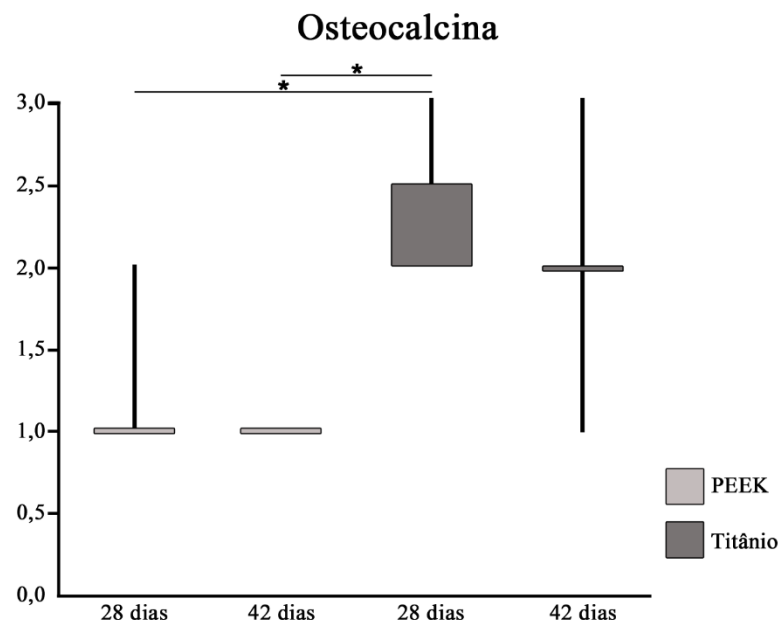


Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

4.5.2 OCN

Na avaliação da imunomarcação de OCN, o grupo PEEK-28d apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação), enquanto o Ti-6Al-4V-28d de 2 (2-3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcação). Aos 42 dias, o PEEK apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcação) e o grupo Ti-6Al-4V apresentou a mediana e o desvio interquartis de 2 (1-3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcação) (Figura 5). Houve diferenças estatisticamente significantes entre o PEEK-28d em comparação ao grupo Ti-6Al-4V-28d, com maior imunomarcação para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p < 0,05$). O padrão se repete entre o grupo Ti-6Al-4V-28d e PEEK-42d, com maior imunomarcação para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p < 0,05$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Análise da imunomarcacão para OCN em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais

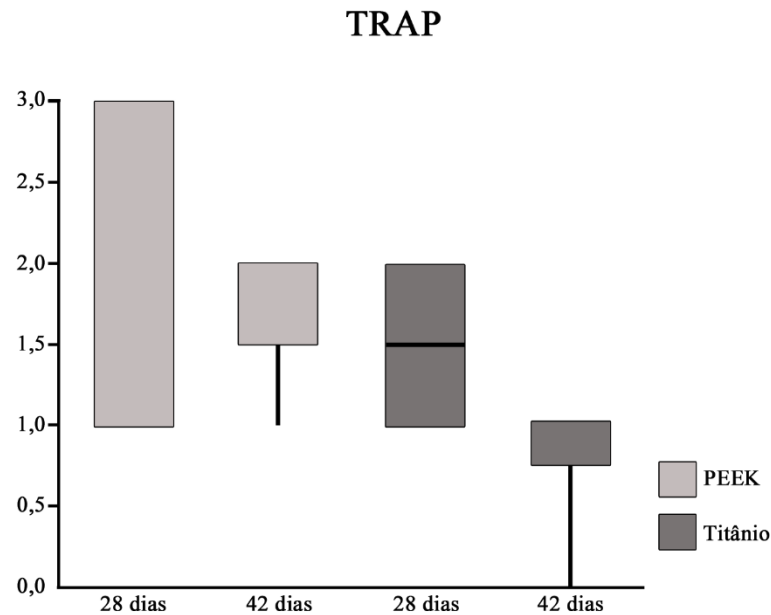


Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

4.5.3 TRAP

Na avaliação da imunomarcacão de TRAP, o grupo PEEK-28d apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (1-3; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcacão), enquanto o Ti-6Al-4V-28d de 1,5 (1-2; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcacão). Aos 42 dias, o PEEK apresentou a mediana e o desvio interquartis de 2 (1-2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão) e o grupo Ti-6Al-4V apresentou a mediana e o desvio interquartis de 1 (0-1; prevaleceu um fraco padrão de imunomarcacão) (Figura 5). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Gráfico 4).

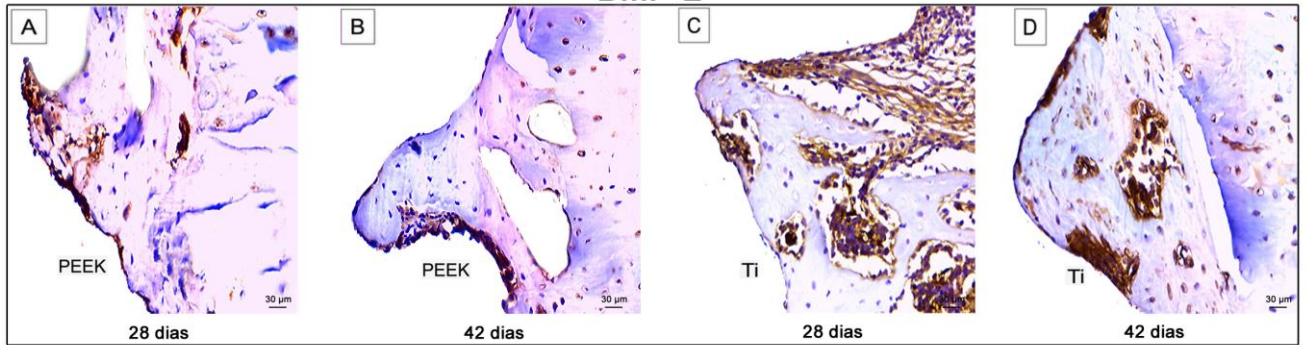
Gráfico 4 - Análise da imunomarcacão para TRAP em tibia dos diferentes grupos e períodos experimentais



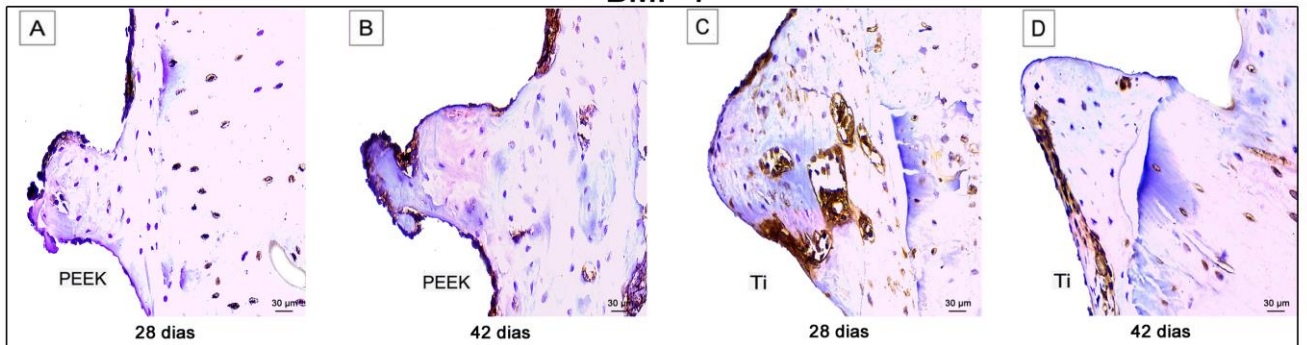
Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

Figura 5 – BMP-2 A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão) - BMP-7 A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão). – Osteocalcina A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e intensa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e moderada imunomarcacão) TRAP A (PEEK 28 dias – discreta área com foco de remodelação e moderada à baixa imunomarcacão); B (PEEK 42 dias – com ossos mais maduros comparado ao PEEK 28 dias e baixa imunomarcacão); C (Titânio 28 dias – tecido ósseo em remodelação e moderada à baixa imunomarcacão); D (Titânio 42 dias – tecido ósseo maduro e organizado e baixa imunomarcacão).

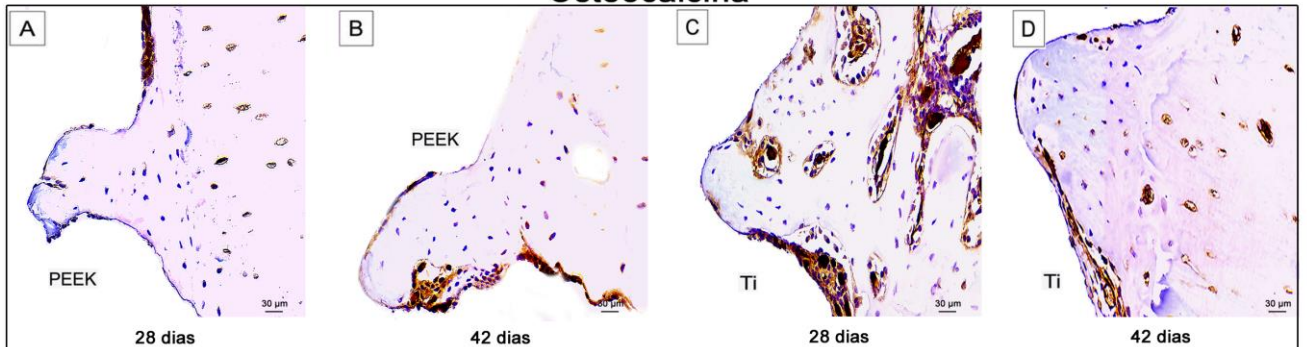
BMP-2



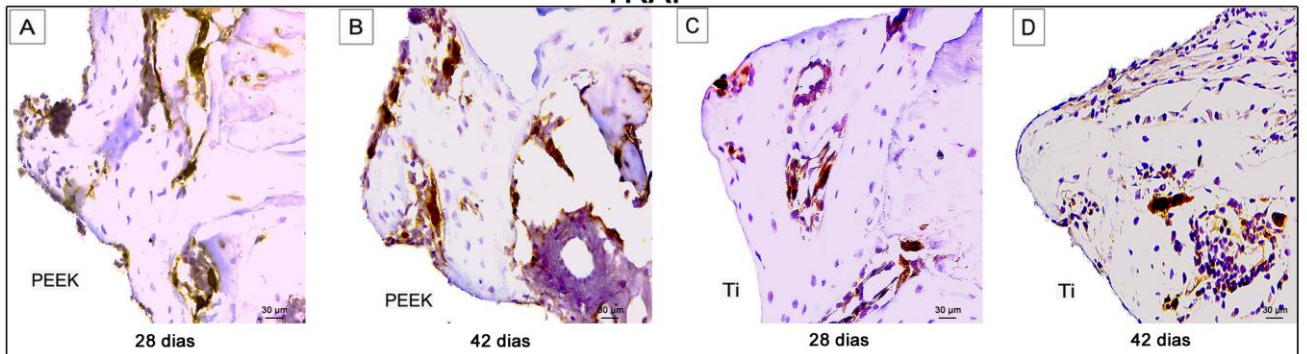
BMP-7



Osteocalcina



TRAP



Fonte: Elaborada pelo Autor (2023)

5 DISCUSSÃO

Investigações acerca de substitutos dos implantes dentários de titânio vem sendo discutido na literatura.^{2,3,19} O PEEK é um polímero sintético orgânico, termoplástico semicristalino poli acromático, biocompatível,^{20,21,22} que apresenta estabilidade de cor, ausência de corrosão e excelente estabilidade de variação térmica.^{23,24} Dentro da Odontologia, o material tem sido estudado e utilizado na confecção intermediários de próteses dentárias, como próteses dentárias provisórias, como material que gera estes intermediários e próteses dentários através de impressoras 3D que dentro de clínicas odontológicas²⁰, e recentemente, como potencial substituto dos implantes de titânio.³⁵ Estas características e outras como estabilidade de cor, material de coloração mais estética, baixo potencial alergênico, biocompatibilidade aos tecidos,^{23,24} aguçaram o interesse para investigação deste material como potencial substituto dos implantes à base de titânio. Assim, a fim de avaliar o reparo ósseo peri-implantar na interface da superfície de implantes PEEK, este estudo utilizou implantes em tíbia de ratos *Wistar* por meio de análise microtomográfica, histopatológica e imunoistoquímica.

A Micro-CT foi adotada por permitir a varredura por completo da região de interesse.³⁶ As imagens obtidas quando reconstruídas permitem quantificar o volume de tecido ósseo mineralizado em contato com a superfície do implante.³⁶ Alguns estudos demonstraram que os resultados do contato osso/implante ao ser analisado pela Micro-CT mostra parâmetros importante da morfologia óssea^{35,52}. Os parâmetros escolhidos para as análise de morfológica óssea foi a porcentagem de volume ósseo (volume ósseo / volume tecidual) e para o tecido ósseo trabeculado foram quantificados espessura óssea trabecular (Tb.Th), separação óssea trabecular (Tb.Sp) e número de osso trabecular (Tb.N).^{53,54}

Na Implantodontia, o implante à base de titânio é bem aceito na literatura em função do bom desempenho clínico, ser osteocondutor⁵⁵ e por permitir osseointegração⁴. Ao longo dos anos, os implantes de titânio sofreram modificações na superfície para permitir melhorias nas propriedades de rugosidade, molhabilidade e alterações químicas.^{56,57,58}

De fato, este estudo demonstrou que o grupo Ti-6Al-4V apresentou dados superiores ao PEEK nos dois períodos avaliados (28 e 42 dias), com a porcentagem

de volume ósseo (BV/TV) formado pelo Ti-6Al-4V de 79,78% e 72,58%, respectivamente, enquanto o PEEK obteve 63,37% e 67,74%, respectivamente, com diferença significantes entre os grupos Ti-6Al-4V-28d e PEEK-28d ($p = 0.023$). Dados semelhantes foram encontrados avaliando radiografias e Micro-CT de implantes inseridos em vertebras, o qual houve maior crescimento ósseo sobre o dispositivo de titânio nos períodos de 3 e 6 meses, enquanto o dispositivo PEEK teve crescimento parcial.⁴² Ainda, o autor reforça que o titânio apresentou maior osteocondutividade, promoção de crescimento ósseo acelerado, melhor osseointegração e estabilidade mecânica comparado ao PEEK.⁴² Na análise comparativa no osso cortical em tíbia de coelhos entre PEEK, PEEK revestido com hidroxiapatita e titânio, os grupos PEEK apresentaram menor BV/TV, sendo 81.3%, 97.3% e 97.8%, respectivamente⁵⁹. Kumar et al.⁶⁰ acredita que um dos motivos da redução da bioatividade do PEEK seria a superfície lisa e bioinerte que ele apresenta.

Nossos achados, revelam resultados superiores na análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) para o grupo Ti-6Al-4V-28d ($p=0.041$) comparado ao grupo PEEK-28d a qual ressalta um maior avanço do processo de osteogênese. Enquanto na análise de separação de trabéculas (Tb.Sp), constatamos que o grupo PEEK-42d apresentou maior Tb.Sp ($p= 0.016$) ao grupo Ti-6Al-4V-42d, ao qual é notório maior quantidade de tecido conjuntivo no histológico para o PEEK, confirmando um possível atraso no processo osteogênico. Esses dados podem ser justificados em um estudo *in vivo* avaliando a osseointegração através da Micro-CT de dispositivos PEEK e titânio em crista ilíaca, o qual nos dois períodos avaliados (28 e 56 dias) observou-se crescimento ósseo esponjoso na superfície do titânio e baixa interação entre o PEEK e o osso circundante local, além da presença de áreas de fibrose.⁶¹

A baixa qualidade óssea no grupo PEEK também foram observadas na análise histopatológica tanto no tecido ósseo cortical, quanto no tecido ósseo medular. O grupo Ti-6Al-4V no período de 28 dias apresentava tecido ósseo viável, rico em osteócitos, em processo de remodelação, com a superfície externa das trabéculas ósseas cobertas irregularmente por células de revestimento. No período de 42 dias, o tecido ósseo apresentava predominantemente maduro de aspecto lamelar, com discretos focos de remodelação. Em contrapartida, no grupo PEEK aos 28 dias, a superfície tecidual que estava em contato com os implantes apresentava-se irregular, sem a preservação da anatomia da superfície do corpo dos implantes, permeado por

tecido conjuntivo infiltrado por plasmócitos, assim como o tecido medular. Enquanto aos 42 dias, de modo semelhante a fase inicial, exibiam camada de tecido ósseo maduro lamelar delgada e irregular, recoberta por células de revestimento.

Em estudos anteriores, dispositivos de PEEK e titânio foram instalados em crista ilíaca, e nas análises histológicas observaram a presença de áreas de fibrose, com ausência de osseointegração na superfície óssea em contato com o PEEK.⁶⁰ Ainda, comparando titânio e PEEK em tíbia de coelhos após 28 dias de implantação, observou a presença de tecido adiposo ao redor do implante PEEK, com tecido ósseo e calcificação reduzida.⁶² Esse tecido ósseo mais imaturo também foi observado avaliando o contato osso-implante (BIC) na região medular em tíbia de coelhos, o qual observou que nas amostras com 12 semanas de implantação óssea, os implantes PEEK apresentavam 0,4% de contato osso-implante, enquanto PEEK-HA (hidroxiapatita) 1,8% e o titânio apresentava 50,3%, sugerindo uma osteocondutividade reduzida.⁵⁹

Olivares-Navarrete et al., 2013 afirmaram que as falhas da osseointegração dos implantes PEEK pode estar associada a capacidade reduzida das células gerarem um ambiente rico de fatores de crescimento para células endoteliais e osteoblásticas.¹⁴ De fato, no presente estudo, o grupo ti-6Al-4V-28d apresentou mais células imunorreativas para BMP2 e OCN, sugerindo um forte padrão de imunomarcacão em comparação com o grupo PEEK-28d e PEEK-42d ($p < 0,05$). A BMP é responsável por atuar na sinalização de três etapas da cascata osteogênica: quimiotaxia, angiogênese com proliferação celular e diferenciação de células troncos de tecidos adjacentes em osteoblastos,⁶³ além disso, está associada a aceleração do crescimento ósseo durante os estágios iniciais da cicatrização.⁶⁴

A BMP7, assim como a BMP2, está associada ao processo de formação óssea, permitindo a diferenciação osteoblástica, favorecendo a osseointegração implantes dentários,⁶⁵ além de atuar na inibição da atividade osteoclástica.³¹ Na análise de BMP7, o ti-6Al-4V-28D apresentou maior imunomarcacão comparado ao PEEK-42d ($p < 0,05$), assim como a BMP2, evidenciando uma maior osteoindução nos grupos de ti-6Al-4V. A atividade osteoindutora do imunomarcador BMP7 foi observada em estudos que avaliaram implantes de titânio em tíbia de ratos tratados com proteína BMP7, o qual constatou melhora de deposição óssea peri-implantar e maior número de osteoblastos no local.^{66,67,68} Resultado diferente foi observado em estudo *in vitro*,

o qual a administração de BMP7 sobre a discos de titânio revestidos com PEEK induziu maior diferenciação osteoblástica,⁶⁹ o que contradiz os nossos resultados.

Para determinar a linhagem osteoblásticas expressas nos estágios tardios,⁷⁰ o presente estudo utilizou o imunomarcador osteocalcina (OCN), fundamental nos processos de mineralização e remodelação óssea.⁷¹ Constatou-se que tanto nos estágios iniciais, quanto nos tardios, o grupo ti-6Al-4V demonstrou maiores resultados em comparação ao grupo PEEK, visto que o grupo ti-6Al-4V-28d apresentou moderado padrão de imunomarcacão para OCN em comparação ao grupo PEEK-28d e PEEK- 42d, com fraco padrão de imunomarcacão ($p<0,05$). Para investigar a ação dos implantes na remodelação óssea, utilizou-se a TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), proteína presente durante todo o ciclo de atividade dos osteoclastos,⁷² associado à ativação e migração de osteoclastos aos locais de reabsorção óssea, além da proliferação dos mesmos.⁷³ No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos e períodos avaliados, uma vez que a TRAP pode estar aumentada quando há carga no local do implante instalado, ou quando associado a processos inflamatórios intensos, como em peri-implantites⁷⁴ ou tratamentos sistêmicos, como a utilização de quimioterápicos.⁷⁵

Diante dos resultados apresentados até aqui, nota-se que os implantes PEEK apresentaram baixa qualidade óssea e atraso no processo de reparo, com volume (BV/TV) e espessura trabecular menor (Tb.Th), além de maior separação entre trabéculas (Tb.Sp), além disso, foi constatado presença de tecido ósseo irregular nas análises histopatológicas, com a presença de células inflamatórias no local, além de menor marcação de proteínas osteoindutoras (BMP2/7) e OCN. A natureza bioinerte do implante PEEK limita sua atividade osteogênica.^{14,60} Todavia é um material precisa ser melhor investigado quanto as suas característica a fim de poder ter potencial para substituir os implantes dentários com ligas de titânio, devido a sua excelente resistência à corrosão, alta resistência mecânica e boa biocompatibilidade.^{76,77,78,79}

Para solucionar a baixa capacidade osteogênica, modificações da superfície do PEEK são sugeridas.^{76,80} Algumas alterações relatadas na literatura são com materiais bioativos (nitretos de silício, nano biovidro, biocerâmicas bifásicas), os quais favorecerem imunomodulação, atenuando as respostas inflamatórias, a fim de criar um microambiente ideal para a formação óssea.^{81,82,83} Ou PEEK revestido com fosfato de magnésio amorfo, o qual detectou níveis elevados de expressão de OCN em cultivo

celular.⁸⁴ Outro estudo demonstrou que o PEEK revestido com jateamento de partículas de titânio também melhoraram a osteoindução celular sobre a superfície do implante.⁸⁵ Ainda, uma possível melhora da hidrofiliabilidade em sua superfície pode favorecer a migração celular e consequente formação óssea.^{85,86}

É importante ressaltar que o presente estudo apresentou algumas limitações: (1) a geometria das espiras do implante de PEEK não foram idênticas as espiras dos implantes de titânio, visto que a indústria responsável pela fabricação apresentou dificuldades em manter o mesmo padrão; (2) os implantes PEEK durante a inserção no leito cirúrgico apresentou pouca estabilidade; (3) a remoção dos implantes de titânio e PEEK para o processamento histológico pode ter danificado o tecido ósseo em contato com a superfície do implante em função do tecido ser imaturo no local neoformado; (4) durante os cortes histológicos na espessura de 5 μm apresentava-se mais friável em relação ao grupo titânio.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se o presente desenho experimental, pode-se concluir que ao final de 42 dias de instalação dos implantes, o tecido ósseo peri-implantar com o implante de PEEK resultou em e com menor indução óssea aos 28 dias, observados pela marcação das BMPs 2 e 7, bem como qualidade e volume ósseo inferiores aos implantes de titânio aos 42 dias.

REFERÊNCIAS

- 1 - Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(2):519-29. doi: 10.1002/jbm.b.31147
- 2 - Thoma DS, Lim HC, Paeng KW, Jung UW, Hämmerle CHF, Jung RE. Tissue integration of zirconia and titanium implants with and without buccal dehiscence defects-A histologic and radiographic preclinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2019;30(7):660-9. doi: 10.1111/clr.13451
- 3 - Rottmar M, Müller E, Guimond-Lischer S, Stephan M, Berner S, Maniura-Weber K. Assessing the osteogenic potential of zirconia and titanium surfaces with an advanced in vitro model. *Dent Mater.* 2019;35(1):74-86. doi: 10.1016/j.dental.2018.10.008
- 4 - Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50(3):399-410. doi: 10.1016/s0022-3913(83)80101-2
- 5 - Cortada M, Giner L, Costa S, Gil FJ, Rodríguez D, Planell JA. Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11(5):287-293. doi: 10.1023/a:1008905229522
- 6 - Schiff N, Grosgeat B, Lissac M, Dalard F. Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. *Biomaterials.* 2002;23(9):1995-2002. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00328-3
- 7 - Sobolev A, Valkov A, Kossenko A, Wolicki I, Zinigrad M, Borodianskiy K. Bioactive coating on Ti alloy with high osseointegration and antibacterial Ag nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(43):39534-44. doi: 10.1021/acsami.9b13849
- 8 - Ansar EB, Ravikumar K, Suresh Babu S, Fernandez FB, Komath M, Basu B, Harikrishna Varma PR. Inducing apatite pre-layer on titanium surface through hydrothermal processing for osseointegration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;105:110019. doi: 10.1016/j.msec.2019.110019
- 9 - Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):527-51. doi: 10.1046/j.0909-8836..t01-2-.x

- 10 - Stocchero M, Jinno Y, Toia M, Ahmad M, Papia E, Yamaguchi S, Becktor JP. Intraosseous temperature change during installation of dental implants with two different surfaces and different drilling protocols: an in vivo study in sheep. *J Clin Med*. 2019;8(8):1198. doi: 10.3390/jcm8081198
- 11 - Eriksson A, Albrektsson T, Grane B, McQueen D. Thermal injury to bone. A vital-microscopic description of heat effects. *Int J Oral Surg*. 1982;11(2):115-21. doi: 10.1016/s0300-9785(82)80020-3
- 12 - Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(5):808-16.
- 13 - Gupta A, Dhanraj M, Sivagami G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. *Indian J Dent Res*. 2010;21(3):433-8. doi: 10.4103/0970-9290.70805
- 14 - Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Gittens RA 1st, Schneider JM, Haithcock DA, Ullrich PF, Slosar PJ, Schwartz Z, Boyan BD. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of angiogenic factors. *Spine J*. 2013;13(11):1563-70. doi: 10.1016/j.spinee.2013.03.047.
- 15 - Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(6):357-64. doi: 10.1034/j.1600-0501.1996.090601.x
- 16 - Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1471-86. doi: 10.1243/09544119JEIM900
- 17 - Ribeiro CF, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Campos MS, Rode SM, Neves AC. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: an in vivo study. *Arch Oral Biol*. 2016;69:33-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.006

- 18 - Hafezeqoran A, Koodaryan R. Effect of zirconia dental implant surfaces on bone integration: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9246721. doi: 10.1155/2017/9246721
- 19 - Greenbaum DS, Masri R, Driscoll CF. Prosthodontic rehabilitation of dental implants with exposed threads: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 2011;105(6):351-5. doi: 10.1016/S0022-3913(11)00071-0
- 20 - Mishra S, Chowdhary R. PEEK materials as an alternative to titanium in dental implants: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(1):208-22. doi: 10.1111/cid.12706
- 21 - Mounir M, Shalash M, Mounir S, Nassar Y, El Khatib O. Assessment of three-dimensional bone augmentation of severely atrophied maxillary alveolar ridges using prebent titanium mesh vs customized poly-ether-ether-ketone (PEEK) mesh: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(5):960-7. doi: 10.1111/cid.12748
- 22 - Ma J, Liang Q, Qin W, Lartey PO, Li Y, Feng X. Bioactivity of nitric acid and calcium chloride treated carbon-fibers reinforced polyetheretherketone for dental implant. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020;102:103497. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103497
- 23 - Wiesli MG, Özcan M. High-performance polymers and their potential application as medical and oral implant materials: a review. *Implant Dent.* 2015;24(4):448-57. doi: 10.1097/ID.0000000000000285
- 24 - Guo L, Smeets R, Kluwe L, Hartjen P, Barbeck M, Cacai C, Gosau M, Henningsen. Cytocompatibility of titanium, zirconia and modified PEEK after surface treatment using UV light or non-thermal plasma. *Int J Sci.* 2019;20(22):5596. doi: 10.3390/ijms.20225596
- 25 - Scolozzi P. Maxillofacial reconstruction using polyetheretherketone patient-specific implants by “mirroring” computational planning. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(3):660-5. doi: 10.1007/s00266-011-9853-2
- 26 - Niu CC, Liao JC, Chen WJ, Chen LH. Outcomes of interbody fusion cages used in 1 and 2-levels anterior cervical discectomy and fusion: titanium cages versus polyetheretherketone (PEEK) cages. *J Spinal Disord Tech.* 2010;23(5):310-6. doi: 10.1097/BSD.0b013e3181af3a84

- 27 - Zhao Y, Wong HM, Wang W, et al. Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured network on polyetheretherketone. *Biomaterials*. 2013;34(37):9264-77. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.071
- 28 - Stawarczyk B, Eichberger M, Uhrenbacher J, Wimmer T, Edelhoff D, Schmidlin PR. Three-unit reinforced polyetheretherketone composite FDPs: influence of fabrication method on load-bearing capacity and failure types. *Dent Mater J*. 2015;34(1):7-12. doi: 10.4012/dmj.2013-345
- 29 - Ramenzoni LL, Attin T, Schmidlin PR. In vitro effect of modified polyetheretherketone (peek) implant abutments on human gingival epithelial keratinocytes migration and proliferation. *Materials*. 2019;12(9):1401. doi: 10.3390/ma12091401
- 30 - Rodrigues DC, Sridhar S, Gindri IM, Siddiqui DA, Valderrama P, Wilson TG Jr, Chung KH, Wadhvani C. Spectroscopic and microscopic investigation of the effects of bacteria on dental implants surfaces. *RSC Adv*. 2016;6:48283-93.
- 31 - Chen X, Ma R, Min J, Li Z, Yu P, Yu H. Effect of PEEK and PTFE coatings in fatigue performance of dental implant retaining screw joint: an in vitro study. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;103:103530. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103530
- 32 - Berbel LO, Banczek EDP, Karoussis IK, Kotsakis GA, Costa I. Determinants of corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy dental implants in an In Vitro model of peri-implant inflammation. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210530. doi: 10.1371/journal.pone.0210530
- 33 - Li LY, Zhou CY, Wei J, Ma J. Quantitative analysis of nFA/PEEK implant interfaces in Beagle dogs. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2014;23(2):166-71.
- 34 - Johansson P, Jimbo R, Kozai Y, Sakurai T, Kjellin P, Currie F, Wennerberg A. nanosized hydroxyapatite coating on PEEK implants enhances early bone formation: a histological and three-dimensional investigation in rabbit bone. *Materials*. 2015;8(7):3815-30. doi: 10.3390/ma8073815
- 35 - Nakahara I, Takao M, Goto T, Ohtsuki C, Hibino S, Sugano N. Interfacial shear strength of bioactive-coated carbon fiber reinforced polyetheretherketone after in vivo implantation. *J Orthop Res*. 2012;30(10):1618-25. doi: 10.1002/jor.22115

- 36 - Diefenbeck M, Mückley T, Schrader C, Schmidt J, Zankovych S, Bossert J, Jandt KD, Faucon M, Finger U. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials*. 2011;32(32):8041-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.046
- 37 - Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(7):1259-6. doi: 10.1002/jbm.b.32938
- 38 - Costa JA, Mendes JM, Salazar F, Pacheco JJ, Rompante P, Câmara MI. Analysis of peri-implant bone defects by using cone beam computed tomography (CBCT): an integrative review. *Oral Radiol*. 2023;39(3):455-66. doi: 10.1007/s11282-023-00683-w
- 39 - Fienitz T, Schwarz F, Ritter L, Dreiseidler T, Becker J, Rothamel D. Accuracy of cone beam computed tomography in assessing peri-implant bone defect regeneration: a histologically controlled study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(7):882-7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02232.x
- 40 - Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1277-91. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.014
- 41 - Ming LG, Wang MG, Chen KM, Zhou J, Han GQ, Zhu RQ. Effect of osthon on apoptosis and bone resorption of osteoclasts cultured in vitro. *Yao Xue Xue Bao*. 2012 Feb;47(2):174-9.
- 42 - Wu SH, Li Y, Zhang YQ, Li XK, Yuan CF, Hao YL, Zhang ZY, Guo Z. Porous titanium-6 aluminum-4 vanadium cage has better osseointegration and less micromotion than a poly-ether-ether-ketone cage in sheep vertebral fusion. *Artif Organs*. 2013;37(12):E191-201. doi: 10.1111/aor.12153
- 43 - Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746
- 44 - Song ZH, Xie W, Zhu SY, Pan JJ, Zhou LY, He CQ. Effects of PEMFs on *Osx*, *Ocn*, *TRAP*, and *CTSK* gene expression in postmenopausal osteoporosis model mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(3):1784-90.

- 45 - Al-Subaie AE, Laurenti M, Abdallah MN, Tamimi I, Yaghoubi F, Eimar H, Makhoul N, Tamimi F. Propranolol enhances bone healing and implant osseointegration in rats tibiae. *J Clin Periodontol*. 2016;43(12):1160-70. doi: 10.1111/jcpe.12632
- 46 - Marinho VC, Celletti R, Bracchetti G, Petrone G, Minkin C, Piattelli A. Sandblasted and acid-etched dental implants: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(1):75-81.
- 47 - Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309.
- 48 - Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018;22(1):255-65. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2
- 49 - Matheus HR, Ervolino E, Faleiros PL, Novaes VCN, Theodoro LH, Garcia VG, de Almeida JM. Cisplatin chemotherapy impairs the peri-implant bone repair around titanium implants: An in vivo study in rats. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):241-52. doi: 10.1111/jcpe.12824
- 50 - Nociti FH Jr, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002;73(9):982-7. doi:10.1902/jop.2002.73.9.982
- 51 - Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, Dornelles RCM, de Almeida JM, Nagata MJH, Okamoto R, Casatti CA, Garcia VG, Theodoro LH. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2019;120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014
- 52 - Haga-Tsujimura M, Nakahara K, Kobayashi E, Igarashi K, Schaller B, Saulacic N. Single-staged implant placement using bone ring technique with and without membrane placement: An experimental study in the Beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(3):263-76. doi: 10.1111/clr.13111

- 53 - Laib A, Hildebrand T, Häuselmann HJ, Rügsegger P. Ridge number density: a new parameter for in vivo bone structure analysis. *Bone*. 1997;21(6):541-6. doi: 10.1016/s8756-3282(97)00205-6
- 54 - Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rügsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1167-74. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1167
- 55 - Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, Kloss F, Gröbe A, Heiland M, Ebker T. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6285620. doi: 10.1155/2016/6285620
- 56 - Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:185-206. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01777.x
- 57 - Esposito M, Ardebili Y, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(7):CD003815. doi: 10.1002/14651858.CD003815.pub4
- 58 - Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*. 2010;28(4):198-206. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.003
- 59 - Cheng Q, Yuan B, Chen X, Yang X, Lin H, Zhu X, Zhang K, Zhang X. Regulation of surface micro/nano structure and composition of polyetheretherketone and their influence on the behavior of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *J Mater Chem B*. 2019;7(37):5713-24. doi: 10.1039/c9tb00943d
- 60 - Kumar N, Ramakrishnan SA, Lopez KG, Madhu S, Ramos MRD, Fuh JYH, Hallinan J, Nolan CP, Benneker LM, Vellayappan BA. Can polyether ether ketone dethrone titanium as the choice implant material for metastatic spine tumor surgery? *World Neurosurg*. 2021;148:94-109. doi: 10.1016/j.wneu.2021.01.059
- 61 - Laratta JL, Vivace BJ, López-Peña M, Guzón FM, Gonzalez-Cantalpeidra A, Jorge-Mora A, Villar-Liste RM, Pino-Lopez L, Lukyanchuk A, Taghizadeh EA, Pino-Minguez J. 3D-printed titanium cages without bone graft outperform PEEK cages with

autograft in an animal model. *Spine J.* 2022;22(6):1016-27. doi: 10.1016/j.spinee.2021.12.004

62 - Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Bone immune response to materials, part II: copper and polyetheretherketone (PEEK) compared to titanium at 10 and 28 days in rabbit tibia. *J Clin Med.* 2019;8(6):814. doi: 10.3390/jcm8060814

63 - Alhussaini AHA. Effect of platelet-rich fibrin and bone morphogenetic protein on dental implant stability. *J Craniofac Surg.* 2019;30(5):1492-6. doi: 10.1097/SCS.00000000000005131

64 - Raza FB, Vijayaragavalu S, Vaidyanathan AK. Bone morphogenetic protein as bone additive around dental implant and its impact on osseointegration: a systematic review. *J Dent.* 2022;23(2 Suppl):336-48. doi: 10.30476/DENTJODS.2021.90931.1536

65 - Kirkwood K, Rheude B, Kim YJ, White K, Dee KC. In vitro mineralization studies with substrate-immobilized bone morphogenetic protein peptides. *J Oral Implantol.* 2003;29(2):57-65. doi: 10.1563/1548-1336(2003)029<0057:IVMSWS>2.3.CO;2

66 - Zhang Y, Song J, Shi B, Wang Y, Chen X, Huang C, Yang X, Xu D, Cheng X, Chen X. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. *Biomaterials.* 2007;28(31):4635-42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.009

67 - Susin C, Qahash M, Polimeni G, Lu PH, Prasad HS, Rohrer MD, Hall J, Wikesjö UM. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): histological observations. *J Clin Periodontol.* 2010;37(6):574-81. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01554.x

68 - Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Fioretti F, Gauthier C, Sebastian V, Schwinté P, Benkirane-Jessel N. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:1061-75. doi: 10.2147/IJN.S72670

69 - Al-Jarsha M, Moulisová V, Leal-Egaña A, Connell A, Naudi KB, Ayoub AF, Dalby MJ, Salmerón-Sánchez M. Engineered coatings for titanium implants to present

ultralow doses of BMP-7. *ACS Biomater Sci Eng.* 2018;4(5):1812-9. doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b01037

70 - Lian JB, Coutts M, Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J Biol Chem.* 1985;260(15):8706-10.

71 - Ivaska KK, Hentunen TA, Vääräniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Väänänen HK. Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18361-9. doi: 10.1074/jbc.M314324200

72- Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982;34(3):285-290. doi: 10.1007/BF02411252

73 - Tran NT, Kim YK, Kim SY, Lee MH, Lee KB. Comparative osteogenesis and degradation behavior of magnesium implant in epiphysis and diaphysis of the long bone in the rat model. *Materials.* 2022;15(16):5630. doi: 10.3390/ma15165630

74 - Córdoba A, Manzanaro-Moreno N, Colom C, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin nanocoated implant surfaces reduce osteoclast activity in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 25;19(11):3319. doi: 10.3390/ijms19113319

75 - Matheus HR, Ervolino E, Faleiros PL, Novaes VCN, Theodoro LH, Garcia VG, de Almeida JM. Cisplatin chemotherapy impairs the peri-implant bone repair around titanium implants: an in vivo study in rats. *J Clin Periodontol.* 2018;45(2):241-52. doi: 10.1111/jcpe.12824

76 - Yakufu M, Wang Z, Wang Y, Jiao Z, Guo M, Liu J, Zhang P. Covalently functionalized poly(etheretherketone) implants with osteogenic growth peptide (OGP) to improve osteogenesis activity. *RSC Adv.* 2020;10(17):9777-85. doi: 10.1039/d0ra00103a

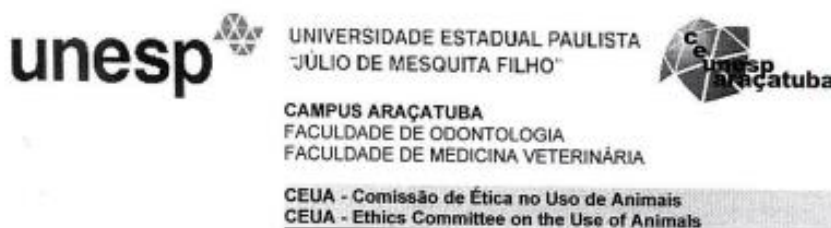
77 - Sagomonyants KB, Jarman-Smith ML, Devine JN, Aronow MS, Gronowicz GA. The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials.* 2008;29(11):1563-72. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.001

- 78 - Gao A, Liao Q, Xie L, Wang G, Zhang W, Wu Y, Li P, Guan M, Pan H, Tong L, Chu PK, Wang H. Tuning the surface immunomodulatory functions of polyetheretherketone for enhanced osseointegration. *Biomaterials*. 2020;230:119642. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119642
- 79 - Li M, Wan P, Wang W, Yang K, Zhang Y, Han Y. Regulation of osteogenesis and osteoclastogenesis by zoledronic acid loaded on biodegradable magnesium-strontium alloy. *Sci Rep*. 2019;9(1):933. doi: 10.1038/s41598-018-37091-8
- 80 - Zhao Y, Wong HM, Lui SC, Chong EY, Wu G, Zhao X, Wang C, Pan H, Cheung KM, Wu S, Chu PK, Yeung KW. Plasma surface functionalized polyetheretherketone for enhanced osseo-integration at bone-implant interface. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(6):3901-11. doi: 10.1021/acsami.5b10881
- 81 - Boschetto F, Marin E, Ohgitani E, Adachi T, Zanocco M, Horiguchi S, Zhu W, McEntire BJ, Mazda O, Bal BS, Pezzotti G. Surface functionalization of PEEK with silicon nitride. *Biomed Mater*. 2020;16(1). doi: 10.1088/1748-605X/abb6b1
- 82 - Yu H, Chen Y, Mao M, Liu D, Ai J, Leng W. PEEK-biphasic bioceramic composites promote mandibular defect repair and upregulate BMP-2 expression in rabbits. *Mol Med Rep*. 2018;17(6):8221-7. doi: 10.3892/mmr.2018.8867
- 83 - Zhang J, Wei W, Yang L, Pan Y, Wang X, Wang T, Tang S, Yao Y, Hong H, Wei J. Stimulation of cell responses and bone ingrowth into macro-microporous implants of nano-bioglass/polyetheretherketone composite and enhanced antibacterial activity by release of hinokitiol. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;164:347-57. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.01.058
- 84 - Ren Y, Sikder P, Lin B, Bhaduri SB. Microwave assisted coating of bioactive amorphous magnesium phosphate (AMP) on polyetheretherketone (PEEK). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;85:107-13. doi: 10.1016/j.msec.2017.12.025
- 85 - Yang Y, Zhang H, Komasa S, Kusumoto T, Kuwamoto S, Okunishi T, Kobayashi Y, Hashimoto Y, Sekino T, Okazaki J. Immunomodulatory properties and osteogenic activity of polyetheretherketone coated with titanate nanonetwork structures. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):612. doi: 10.3390/ijms23020612
- 86 - Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, Ferraris S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response,

avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater.* 2018;79:1-22. doi:
10.1016/j.actbio.2018.08.013

ANEXOS

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da dinâmica do reparo ósseo peri implantar em contato com o poli éter-éter cetona (PEEK) como substituto dos implantes dentários à base de titânio**", Processo FOA nº 00424-2020, sob responsabilidade de Wirley Gonçalves Assunção apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de Dezembro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Dezembro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the dynamics of peri-implant bone repair in contact with polyether ether ketone (PEEK) as substitute for titanium-based dental implants**", Protocol FOA nº 00424-2020, under the supervision of Wirley Gonçalves Assunção presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2021.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
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 - Via Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br