



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021025891-8 A2

(22) Data do Depósito: 21/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
04/07/2023

(54) Título: FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

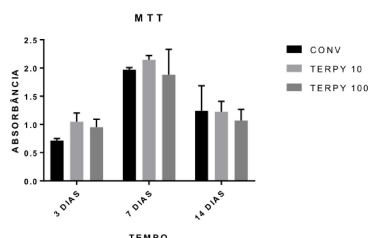
(51) Int. Cl.: A61K 6/58; A61K 6/70; A61K 6/816.

(52) CPC: A61K 6/58; A61K 6/70; A61K 6/816.

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

(72) Inventor(es): ROBERTA OKAMOTO; PAULO NORONHA LISBOA FILHO; IGOR LEBEDENCO KITAGAWA; CRISTINA ANTONIALI SILVA; LETÍCIA PITOL PALIN; FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA; ROBERTO SANTANA DA SILVA.

(57) Resumo: FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS A tecnologia proposta consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes osseointegráveis), utilizando uma molécula que atua como doadora de óxido nítrico, um vasodilatador que possui efeito local, melhorando o fluxo sanguíneo e consequentemente atuando de forma favorável ao processo de reparo periimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na Ruthenylpyridine, uma substância desenvolvida na Faculdade de Farmácia de Ciências Farmacêuticas da USP/Ribeirão Preto e que tem a sua ação vasodilatadora comprovada cientificamente. O processo de funcionalização da superfície dos implantes é realizado a partir da técnica de layer by layer, onde a partir da interposição de camadas com diferentes cargas elétricas, cria-se um substrato para que a molécula funcionalizadora (no caso, o doador de óxido nítrico) esteja localizado externamente à superfície do implante. A ideia implícita nesta tecnologia consiste na ação da Ruthenylpyridine como vasodilatador local, promovendo uma melhora no fluxo sanguíneo que terá um efeito favorável sobre o processo de reparo ósseo, contribuindo para que os eventos celulares e teciduais sejam (...).



FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

INTRODUÇÃO

[001] O processo para o desenvolvimento da tecnologia iniciou-se a partir da escolha de uma concentração do fármaco (molécula funcionalizadora) que possibilitasse o estímulo de osteoblastos quanto ao processo de mineralização óssea sem que houvesse prejuízo da viabilidade e metabolismo celular). Para tanto, foram realizados testes em culturas de células onde duas concentrações diferentes do fármaco foram testadas (Rutherpy nas concentrações de 10uM e 100uM). Vale destacar que o fármaco foi incorporado à superfície de discos de titânio a partir da técnica de layer by layer e testes como MTT, nódulos de mineralização e genotoxicidade foram realizados. Selecionada a concentração de Rutherpy que resultasse em melhores resultados de mineralização sem prejuízo na viabilidade celular, passou-se para os experimentos in vivo. Nesta etapa, utilizou-se como modelo experimental o implante imediato realizado em maxila de ratas, na região do 1o molar superior. Realizou-se a exodontia do 1o molar superior, seguido da instalação imediata do implante (medida 1,4mm x 2,7mm) com a funcionalização por Rutherpy (concentração selecionada de 10µM) em comparação com o implante de superfície convencional, vinda de fábrica. A validação da resposta de osseointegração foi obtida 28 dias após a instalação dos implantes, quando por testes biomecânicos, torque de remoção, foi avaliada a força (N.cm) necessária para remover o implante do seu sítio de instalação. Os resultados observados mostraram que os valores do torque de remoção foram significativamente maiores para os implantes funcionalizados por Rutherpy do que os implantes convencionais.

CAMPO DE APLICAÇÃO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção está relacionada à área de Farmacologia e Medicina. A possível aplicação desta tecnologia está na confecção de implantes osseointegráveis com a superfície ativada pelo fármaco doador de óxido nítrico.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] Estudos anteriores mostram o efeito vasodilatador do fármaco aqui utilizado para a funcionalização da superfície dos implantes. Este efeito vasodilatador ocorre a partir do seu papel como liberador de óxido nítrico, melhorando o fluxo sanguíneo local, o que leva a uma melhora na resposta de reparo ósseo.

[004] Estudos anteriores também mostram o papel do óxido nítrico e seu efeito vasodilatador melhorando o processo de reparo ósseo. Quanto a associação de efeito vasodilatador a superfície dos implantes, não há estudos na literatura que utilizam esta técnica. Artigos que mostram o efeito vasodilatador da molécula doadora de óxido nítrico (Ruthenium): (Lunardi, C.H.; Silva, R.S.; Bendhack, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes, Braz. J. Med. Biol. Res. 42 (2009): 87-93 - Munhoz, F.C.; Potje, S.R.; Pereira, A.C.; Daruge, M.G.; Silva, R.S.; Bendhack, L.M.; Antoniali, C. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ in spontaneously hypertensive rats. Nitric Oxide 26 (2012):111-117 - Potje, S.R.; Munhoz, F.C.; Perassa, L.A.; Graton, M.E.; Pereira, A.A.F.; Nakamune, A.C.M.S.; Silva, R.S.; Bendhack, L.M.; Sumida, D.H.; Antoniali, C. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. European Journal of Pharmacology 741 (2014):222-229).

[005] Artigos que mostram que o óxido nítrico melhora o processo de reparo tecidual: - Schwentker A; Billiar, T.R. Nitric Oxide and wound repair. Surg. Clin. North. Am. 2003. Jun; 83(3):521-530. - Chae, H.J.; Park, R.K.; Chung, H.T.; Kang, J.S. et al. Nitric Oxide is a regulator of bone remodeling. J. Pharm Pharmacol. 1997 Sep; 49(9): 897-902. - Afzal F.; Polak J.; Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. J. Pathol. 2004. Apr; 202(4):503-10.

[006] Quanto a aplicação local do óxido nítrico ou mesmo da molécula aqui testada (Ruthenium), não foi encontrado nenhum documento com esta tecnologia.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[007] A atual proposta é inovadora, pois busca incorporar o fármaco doador de óxido nítrico à superfície do implante, funcionalizando este dispositivo que é instalado no

tecido ósseo. A idéia é acelerar as respostas celulares de forma que o processo de osseointegração seja alcançado mais rapidamente sem prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[008] Esta proposta tem por objetivo funcionalizar a superfície dos implantes com um fármaco doador de óxido nítrico através da técnica *Layer by Layer* (LBL), que consiste na adsorção de polieletrólitos ou nanopartículas em um substrato sólido, geralmente com certo desequilíbrio de cargas na sua superfície.

[009] A carga do material a ser adsorvido deve ser contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática. Ao adsorver na superfície do substrato, parte da carga do material não adsorvido não é compensada, invertendo a carga resultante da superfície e permitindo a adsorção de outro material com carga distinta ao anterior. A adsorção de um novo material de carga distinta ao inicial ocorre com a compensação parcial de suas cargas, permitindo nova adsorção, camada por camada, sendo regido por ligações iônicas, podendo haver significativa contribuição de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, dentre outras.

[010] Para o desenvolvimento desse dispositivo para fins de utilização como implante odontológico, foram utilizados o dióxido de titânio (TiO_2), o poli-4-estireno sulfonato de sódio (PSS) como substratos para as camadas e o complexo de rutênio com Nitrosil (Terpy) como molécula funcionalizante. Um filme de LBL de PSS e TiO_2 foi crescido na superfície do implante, dando origem a um dispositivo de ancoragem para a Ruthenylpy, um complexo carregado positivamente, resultando na seguinte sequência de filmes LBL: uma camada de PSS, uma camada de TiO_2 e por fim, uma camada de PSS, considerando-se os possíveis sítios positivos presentes na estrutura deste fármaco. Esta técnica foi inicialmente executada em discos de titânio, com texturização vinda de fábrica e sobre esta superfície foi realizado o LBL com a Ruthenylpy, mas concentrações de 10uM e 100uM, para que os experimentos em culturas de células fossem executados. Estes experimentos foram realizados utilizando se células mesenquimais coletadas do fêmur de ratos, que foram cultivados sobre os discos de titânio com as diferentes superfícies testadas, com o objetivo de selecionar a concentração de

Rutherpy mais efetiva e segura que estimulasse a formação de nódulos de mineralização das células sem prejudicar o seu metabolismo e a sua viabilidade.

[011] Os resultados mais favoráveis, quando avaliados em conjunto, foram observados com a concentração de 10uM de Rutherpy. Na sequência, foram realizados os testes *in vivo* onde a concentração de 10uM de Rutherpy foi aplicada através da técnica de LBL na superfície dos implantes de titânio (dimensões de 1.4mm de diâmetro por 2.7 mm de comprimento) e que foram instalados na maxila, imediatamente após a exodontia do 1º molar superior em ratas sem comprometimento sistêmico. Portanto, foram realizados os experimentos *in vivo*, utilizando o modelo experimental de ratas e que foram submetidas à cirurgia de exodontia do 1º molar superior sendo, no mesmo tempo cirúrgico, instalado o implante de titânio com superfície funcionalizada ou não.

[012] Passados 28 dias da cirurgia de instalação dos implantes, foi realizado o teste biomecânico (torque de remoção) onde um torquímetro digital foi acoplado à cabeça do implante instalado na maxila de ratos e foi mensurada a força necessária para remover este implante. Estes experimentos mostraram que foi necessária uma força significativamente maior para a remoção dos implantes funcionalizados com Rutherpy em comparação aos implantes de superfície convencional (Teste t não pareado, $p < 0,05$). Portanto, a superfície funcionalizada com Ruterpy 10uM mostrou uma melhora significativa na resposta de osseointegração. Vale destacar a sua resposta bastante favorável nos testes em culturas o que ainda torna mais interessante a sua utilização como uma estratégia para a melhora da resposta reparacional após a instalação dos implantes.

[013] As Figuras 1A, 1B, 2, 3 e 4 apresentam gráficos contendo os resultados referentes aos experimentos de LBL.

[014] A Figura 1 contém os gráficos referentes aos dados observados quanto aos experimentos de culturas de células, onde a partir do ensaio de MTT aos 3, 7 e 14 dias, em que foi avaliado o metabolismo das células mesenquimais em contato com discos que possuem superfícies de implantes convencionais (Figura 1A) e neste mesmo arquivo, a Figura 1B mostra o cálculo em porcentagem, realizado a partir dos valores de MTT que mostram a manutenção da viabilidade celular durante os períodos

avaliados e frente às superfícies testadas. Estes resultados, avaliados conjuntamente mostram que as superfícies mantêm a viabilidade celular. Os resultados são referentes ao MTT onde foi avaliado o metabolismo celular das células em contato com as diferentes concentrações da Rutherpy (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 ($p=0,5945$) e observou-se diferença estatisticamente significativa na variável tempo ($p<0,0001$). Pode-se observar que aos 7 dias, observa-se maior absorbância em comparação aos demais períodos avaliados. Os valores são representativos da viabilidade celular, em porcentagem, calculada a partir dos valores de absorbância para as superfícies convencional, Rutherpy 10 μ M, Rutherpy 100 μ M. Valores acima de 70% são indicativos de manutenção da viabilidade celular.

[015] A Figura 2 mostra o potencial que as superfícies testadas têm para estimular a formação de nódulos de mineralização pelas células em cultura e neste gráfico observa um potencial significativo da superfície Rutherpy 10 μ M em estimular a mineralização. Os resultados referentes a formação de nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento das células sobre as superfícies funcionalizadas com a Rutherpy 10 μ M e 100 μ M neste estudo. Observou-se que a superfície Rutherpy 10 apresenta-se com maiores valores do que a superfície convencional e Rutherpy 100 ($p<0,05$), ou seja, a superfície Terpy 10uM apresenta um maior estímulo para a formação de nódulos de mineralização pelas células em cultura.

[016] A Figura 3 mostra a genotoxicidade das células em cultura quando se mantiveram em contato com as superfícies, testadas aos 5 e 10 dias. Observou se que aos 5 dias, há uma redução significativa da quantidade de micronúcleos,tanto para os 5 e 10 dias, mostrando o seu baixo potencial de toxicidade às células. Estes valores baixos se mantiveram aos 10 dias, mostrarndo que ambas as superfícies têm baixo potencial de toxicidade para as células em cultura. Os valores são representativos quanto ao número de micronúcleos formados na presença das superfícies testadas: convencional, Rutherpy 10 e 100 μ M. A partir da aplicação do teste ANOVA 2 fatores (tratamento x tempo), observa-se que há uma interação entre estes ($p=0,0337$) e observa-se

diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos avaliados ($p=0,0456$). Na avaliação entre as superfícies, observa-se que aos 5 dias, há diferença estatisticamente significativa entre convencional e Rutherpy 10 μ M ($p=0,0092$) e convencional e Rutherpy 100 μ M ($p=0,0106$). A presença de micronúcleos representa toxicidade para as células em cultura. Portanto, as superfícies terpy mostraram com baixa genotoxicidade.

[017] A Figura 4 mostra o experimento *in vivo* onde foi avaliado o torque de remoção após a instalação de implantes com superfície convencional e com a superfície Rutherpy 10 μ M, aos 28 dias pós operatórios. Estes resultados mostram que há um aumento significativo do torque de remoção para a superfície Rutherpy 10 μ M em comparação à superfície convencional, mostrando que esta superfície experimental promove respostas mais favoráveis ao processo de reparo periimplantar, melhorando a resposta de osseointegração. Os valores médios do torque de remoção aos 28 dias após a instalação de implantes convencionais em comparação aos implantes funcionalizados com Rutherpy 10 μ M, em animais Controle. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a superfície TPY e Convencional (teste t, não pareado, $p<0,05$), onde a superfície Terpy mostrou o melhor resultado.

PROBLEMA A SER RESOLVIDO

[018] A melhora do processo de osseointegração inclusive considerando-se a possibilidade de aceleração desta resposta em função do estímulo vasodilatador promovido pela liberação de óxido nítrico pelo efeito da Rutherpy incorporada à superfície do implante.

DIFERENCIAL DA INVENÇÃO

[019] O diferencial da tecnologia proposta é a possibilidade de se 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 mais favoráveis quanto a osseointegração e otimizando o período entre cirurgia de instalação de implantes e procedimentos reabilitadores.

ANÁLISE COMPARATIVA E VIABILIZAÇÃO

[020] A atual proposta é inovadora, pois busca incorporar o fármaco doador de óxido nítrico à superfície do implante, funcionalizando este dispositivo que é instalado no tecido ósseo. A idéia é acelerar as respostas celulares de forma que o processo de osseointegração seja alcançado mais rapidamente sem prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

[021] A intenção é de que esta tecnologia, uma vez que tenha a comprovação da sua segurança e eficácia, seja disponibilizada para que os implantes com esta superfície ativada por vasodilatador local seja comercializada e disponibilizada para a população. O intuito é favorecer e acelerar o processo de osseointegração, melhorando a qualidade e quantidade do tecido ósseo, principalmente frente a condições fisiológicas que podem ser encontradas na população, no caso, condições sistêmicas alteradas ou até mesmo a senescência.

[022] 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, consideramos que o diferencial da nossa superfície consiste na incorporação de uma molécula que atua localmente, ativando respostas celulares no sítio reparacional. Esta resposta celular consiste na melhorar do fluxo sanguíneo local, aspecto que sabidamente favorece as respostas reparacionais. O dispositivo proposto apresenta um grande potencial para melhorar a resposta de osseointegração.

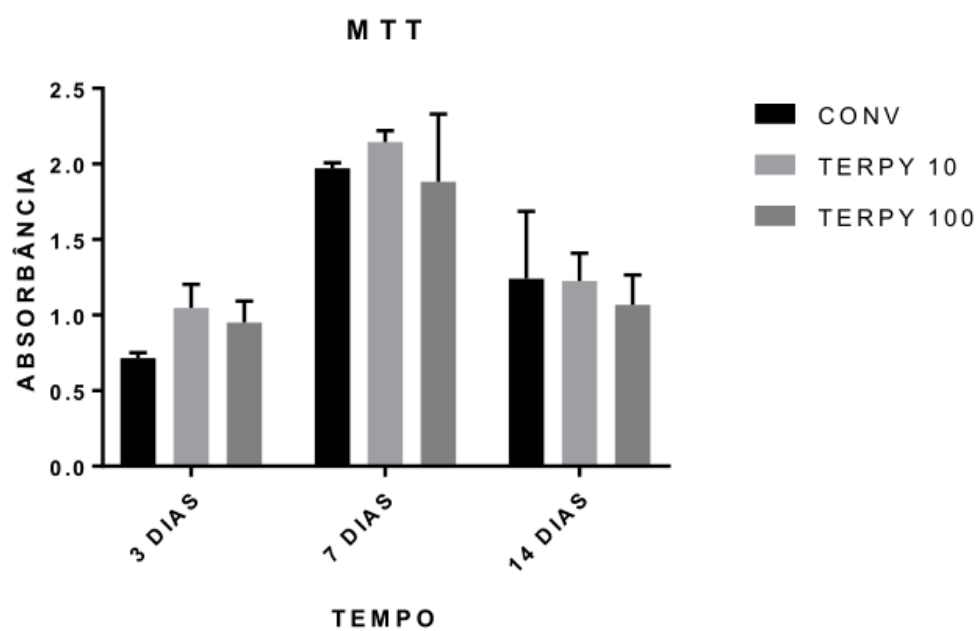
INOVAÇÃO SOCIAL

[023] A realização desta tecnologia, melhorando a bioatividade da superfície do implante é importante para que procedimentos reabilitadores na cavidade oral, como a instalação de implantes osseointegráveis seja acessível a maior parte dos pacientes. Muitos destes apresentam algum tipo de contra-indicação ou um planejamento cirúrgico com um grau de complexidade maior, justamente pela pior qualidade do leito ósseo receptor. Esta tecnologia permitirá que melhores respostas celulares do tecido ósseo sejam obtidas, durante a osseointegração, permitindo que esta técnica reabilitadora seja acessível à maior parte dos pacientes.

REIVINDICAÇÃO

1. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS, a dita funcionalização **caracterizada por** funcionalizar a superfície dos implantes com um fármaco doador de óxido nítrico através da técnica *Layer by Layer* (LBL), utilizando o dióxido de titânio (TiO_2), o poli-4-estireno sulfonato de sódio (PSS) como substratos para as camadas e o complexo de rutênio com Nitrosil (Rutherpy) como molécula funcionalizante; em que um filme de LBL de PSS e TiO_2 foi crescido na superfície do implante, dando origem a um dispositivo de ancoragem para a Rutherpy, um complexo carregado positivamente, resultando na seguinte sequência de filmes LBL: uma camada de PSS, uma camada de TiO_2 e por fim, uma camada de PSS, considerando-se os possíveis sítios positivos presentes na estrutura deste fármaco; em que foi inicialmente executada em discos de titânio, com texturização vinda de fábrica e sobre esta superfície foi realizada o LBL com a Rutherpy, mas concentrações de 10uM e 100uM, para que os experimentos em culturas de células fossem executados; em que os experimentos foram realizados utilizando-se células mesenquimais coletadas do fêmur de ratos, que foram cultivados sobre os discos de titânio com as diferentes superfícies testadas, com o objetivo de selecionar a concentração de Rutherpy mais efetiva e segura que estimulasse a formação de nódulos de mineralização das células sem prejudicar o seu metabolismo e a sua viabilidade; em que na sequência, foram realizados os testes *in vivo* onde a concentração de 10uM de Rutherpy sendo aplicada pela técnica de LBL na superfície de implantes de titânio, com as dimensões de 1.4 mm de diâmetro por 2.7 mm de comprimento e que foram instalados na maxila, região de molares de ratas sem comprometimento sistêmico; em que foram realizados os experimentos *in vivo*, utilizando o modelo experimental de ratas e que foram submetidas à cirurgia de exodontia do 1º molar superior sendo, no mesmo tempo cirúrgico, instalado o implante de titânio com superfície funcionalizada ou não; em que passados 28 dias da cirurgia de instalação dos implantes, foi realizado o teste biomecânico (torque de remoção) onde um torquímetro digital foi acoplado à cabeça do

implante instalado na maxila de ratos e foi mensurada a força necessária para remover este implante.

**FIGURA 1A**

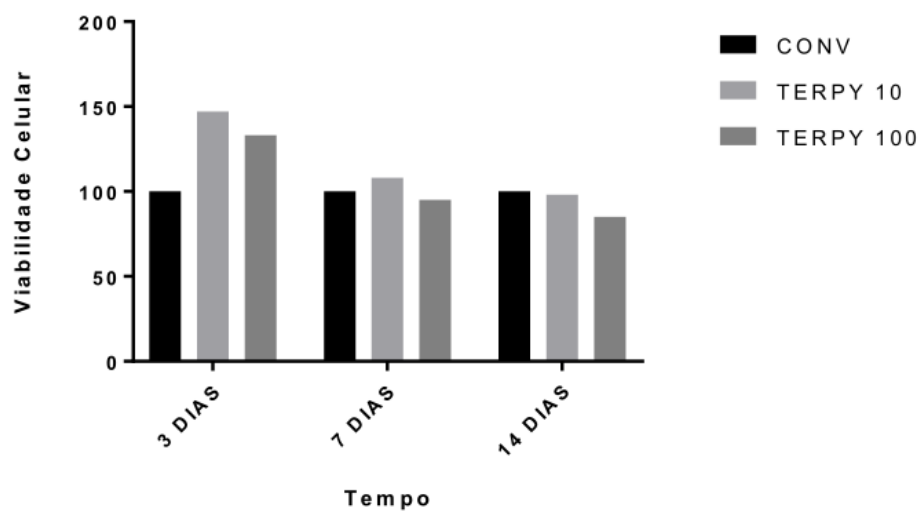


FIGURA 1B

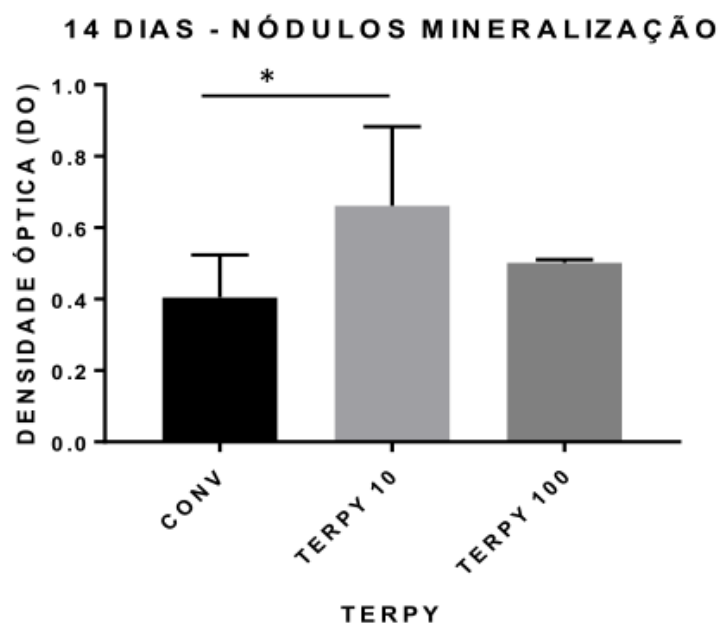
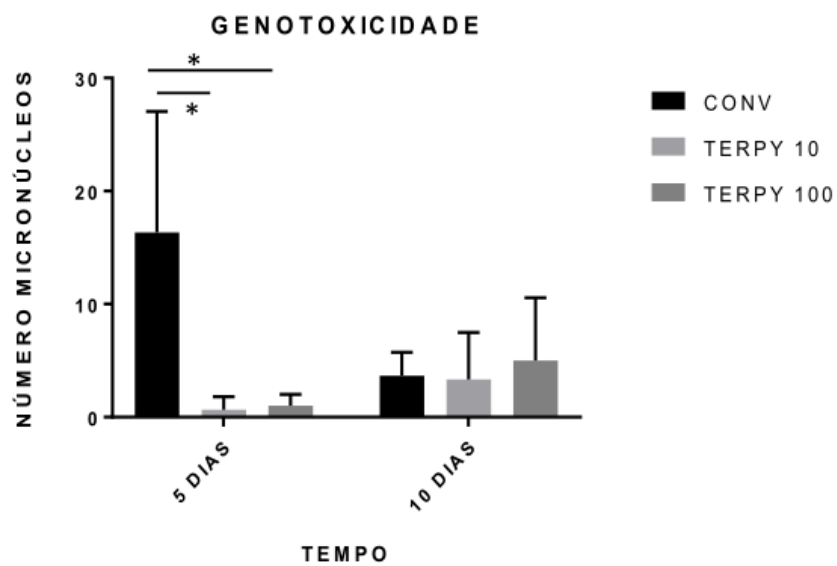


FIGURA 2

**FIGURA 3**

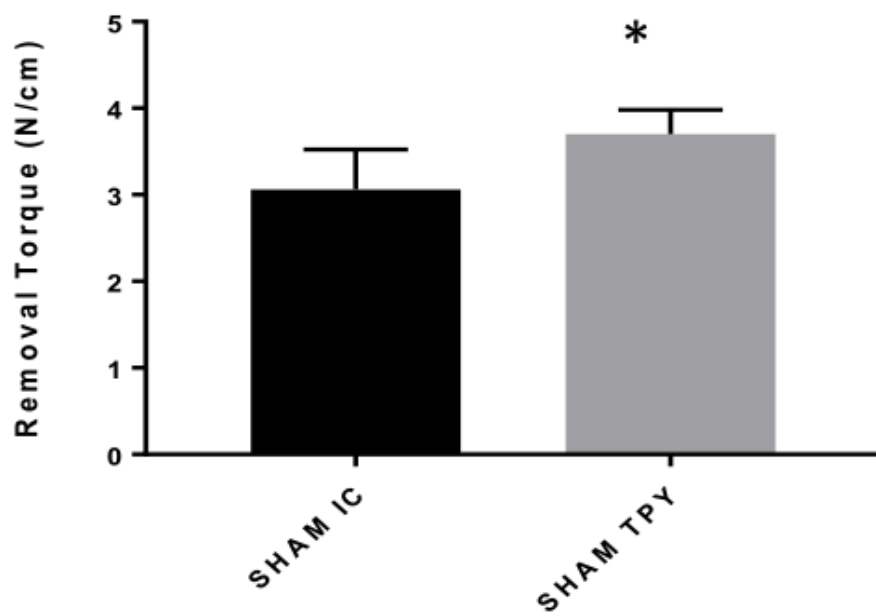


FIGURA 4

RESUMO

FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS

A tecnologia proposta consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes osseointegráveis), utilizando uma molécula que atua como doadora de óxido nítrico, um vasodilatador que possui efeito local, melhorando o fluxo sanguíneo e consequentemente atuando de forma favorável ao processo de reparo periimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na Rutherpy, uma substância desenvolvida na Faculdade de Farmácia de Ciências Farmacêuticas da USP/Ribeirão Preto e que tem a sua ação vasodilatadora comprovada cientificamente. O processo de funcionalização da superfície dos implantes é realizado a partir da técnica de *layer by layer*, onde a partir da interposição de camadas com diferentes cargas elétricas, cria-se um substrato para que a molécula funcionalizadora (no caso, o doador de óxido nítrico) esteja localizado externamente à superfície do implante. A ideia implícita nesta tecnologia consiste na ação da Rutherpy como vasodilatador local, promovendo uma melhora no fluxo sanguíneo que terá um efeito favorável sobre o processo de reparo ósseo, contribuindo para que os eventos celulares e teciduais sejam favorecidos e consequentemente haja uma melhora na qualidade do tecido ósseo que atuará como leito receptor para procedimentos reabilitadores que serão realizados na sequência.