



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



DEPARTAMENTO DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E PRÓTESE

Fernanda Costa Yogui

**Caracterização e avaliação randomizada de
superfícies de liga de titânio modificada por hidroxiapatita
e hidroxiapatita incorporada com estrôncio em ratas
saudáveis e osteoporóticas**

Araçatuba

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Y54c Yogui, Fernanda Costa.
Caracterização e avaliação randomizada de superfícies de liga de titânio modificada por hidroxiapatita e hidroxiapatita incorporada com estrôncio em ratas saudáveis e osteoporóticas / Fernanda Costa Yogui. - Araçatuba, 2020
27 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Fellippo Ramos Verri
Coorientadora: Profa. Ana Paula Ramos
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Durapatita 2. Estrôncio 3. Osteoporose 4. Implantes dentários T.

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Fernanda Costa Yogui

**Caracterização e avaliação randomizada de
superfícies de liga de titânio modificada por hidroxiapatita
e hidroxiapatita incorporada com estrôncio em ratas
saudáveis e osteoporóticas**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do
título de Mestre em Ciência Odontológica – Área de
Concentração em Biomateriais.**

**Orientador: Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ramos e
Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto**

Araçatuba

2020

A Deus

Primeiramente, quero demonstrar a minha gratidão à Deus por ter guiado os meus caminhos até aqui, e por ter colocado pessoas incríveis (verdadeiros anjos) durante toda a minha trajetória. Agradeço por me abençoar com mais esta conquista, por renovar a cada dia a minha fé e minha esperança, por estar sempre presente na minha vida e nas minhas orações e me ensinar a cada dia mais sobre o Amor.

A minha Família

Dedico esta conquista aos meus pais **Helena Silva Costa Yogui** e **Luis Carlos Yogui** por todos os ensinamentos, pelas orações, por todo o carinho e amor, por serem os meus maiores exemplos de honestidade, caráter, bondade, determinação e principalmente de demonstração de amor e fé. Quem conhece ou já ouviu pelo menos a voz de vocês sabem o quanto vocês são abençoados, sábios e com um alto astral mágico que contagia a todos. Pais, vocês são meus pilares que me ajudaram a crescer e evoluir pessoalmente, profissionalmente e espiritualmente! Sou imensamente grata por ter pais tão maravilhosos como vocês. Pai e Mãe amo muito vocês!

Dedico aos meus irmãos **Mauricio**, **Diego**, **Luis Vinícius** e **Amanda**, vocês são meus maiores exemplos de que a felicidade está nas coisas simples, pois qualquer momento do dia com vocês se transformam em festa, seja ajudando a fazer um trabalho de escola, tomando um café da tarde, ou sentados no sofá assistindo tv e eu pedindo para vocês abaixarem o som ou mudarem de canal, pois já assistiram aquele filme umas mil vezes. Brincadeiras a parte, eu me orgulho muito de vocês, vocês são grandemente abençoados e assim como os nossos pais, vocês têm o dom da alegria que contagia. Muito obrigada por estarem sempre presente e mesmo quando estou longe me mandam mensagens perguntando se estou bem. Amo muito vocês!

Ao meu namorado **Rodrigo**, o queridinho das minhas avós, e o que mima todos os animaizinhos (seja cachorro, gato, cavalo, vaca, ...) do sítio. Obrigada meu amor por estar sempre presente, por me apoiar, incentivar, ajudar, por ser meu companheiro de aventuras. Você é o meu exemplo de integridade, determinação e coragem. Sou

muito feliz e grata por ter você ao meu lado e aos poucos estar realizando os nossos sonhos juntos. Te amo muito!

Ao meu orientador

Agradeço ao meu ilustre professor, orientador e amigo Doutor **Fellippo Ramos Verri**, pelo qual tenho imensa admiração e respeito, que me orientou nas disciplinas de Prótese Removível, Reabilitação Oral, curso de atualização em Implantodontia e no meu curso de Mestrado. Professor, foi o seu talento e paixão pelo que você faz que despertou em mim o amor pela Reabilitação oral e mudou à minha maneira de ver o mundo. Sou muito grata por todo conhecimento clínico e científico que você me proporcionou, pelos conselhos, orientações e principalmente, pela sua amizade! Sou muito feliz por ter sido sua orientada e tenho muito orgulho de ter feito parte da sua equipe. Professor, muito obrigada!

As minhas admiráveis professoras coorientadoras

Sou uma pessoa muito privilegiada em ter duas mulheres incríveis como coorientadoras.

Muito obrigada Professora Doutora **Ana Paula Ramos**, que mesmo me conhecendo pouco no início, confiou em mim, abriu as portas do seu laboratório e me acolheu. Tenho imensa gratidão a você por toda a ajuda, orientação, e principalmente, pela paciência que teve comigo, pois tive que relembrar e aprender muitos conceitos de química. Professora, você é uma mulher maravilhosa, uma mãe encantadora e uma pesquisadora admirável, sem você este estudo não teria acontecido, gratidão!

Professora e amiga Doutora **Roberta Okamoto**, não tenho nem palavras para demonstrar a você a minha gratidão. Lembro-me até hoje de um dia no ano de 2012 (no meu 1º ano da graduação) que comentei com a minha mãe que queria fazer estágio, que muitos colegas na minha turma faziam, mas que eu não sabia o que deveria fazer para conseguir, mas Deus prepara sempre o melhor para nós, e naquela mesma semana durante a aula de anatomia você me convidou para fazer estágio. Fui muito abençoada e feliz em tê-la como orientadora de iniciação científica durante toda minha graduação e como minha coorientadora no mestrado. Muito obrigada por acreditar em mim e pelo incentivo que você me deu para continuar e fazer o mestrado. Te amo!

À Banca Examinadora

Agradeço aos Professores **Juliano Milanezi de Almeida** e **Pietro Ciancaglini**, por terem aceitado ao meu convite, e disponibilizarem o seu tempo para lerem o meu trabalho, é uma honra imensa ter professores tão brilhantes como vocês como minha banca examinadora.

Professor Doutor **Pietro Ciancaglini**, nos conhecemos em São Paulo em 2018 no congresso BRADOO, e como sempre, você foi super amigável e gentil, e conversando ali, acabamos descobrindo que tínhamos uma amiga em comum, a Professora Ana Paula. Professor, estou muito feliz por tê-lo como banca, te admiro muito!

Professor Doutor **Juliano Milanezi de Almeida**, sou muito grata a você por ter me acolhido nas clínicas de Periodontia, não sei se você se lembra, mas eu era da ala de outro professor, mas o meu box era vizinho da sua ala, e você mesmo assim sempre nos ajudou, ensinou e nos orientou com a maior dedicação e paciência. Professor, muito obrigada pela sua paciência, dedicação e proatividade, você me proporcionou muito conhecimento!

Aos meus amigos da salinha do Chefe e da Pós-graduação

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram presentes durante o meu percurso, em especial aos meus amigos da salinha do Chefe (Prof. Fellippo).

À doutoranda **Hiskell** por toda a ajuda, por se preocupar comigo e as vezes ser meio “mãezona”, você é como uma irmã para mim. Uma pessoa é uma menina de ouro, super alto astral, dedicada, preocupada com o bem-estar do outro e que nunca negou esforços para me ajudar. Sua presença e dedicação facilitou muito o meu mestrado, pois sempre tivemos uma a outra para nos apoiar. Sentirei saudade das nossas viagens juntas para Ribeirão, da comida da Dona Helenice, do churrasco do Sr Amâncio. Sou muito grata a você e a sua família. Te amo amiga!

Ao Doutor **Ronaldo**, amigo já sinto saudades das suas lamentações na salinha do Chefe e da sua playlist eclética (ora era hard rock, ora era pagode, ora era músicas

de São João). Amigo, você é uma pessoa com um coração gigante e humilde, um dentista excelente e super atencioso, um pesquisador super dedicado e tenho certeza de que será um pai exemplar e amoroso. Muito obrigada pela paciência, pela ajuda (com os meus animais, com as revisões sistemáticas, com os pacientes) e pela amizade!

Aos meus amigos de Pós-graduação **Rodrigo Capalbo, Lara Esteves, Lariana Camacho, Caroline Chepernate, Leandro Rahal, Mariana Bis, Cleidiel Lemos, Jéssica Gomes, João Pedro Limirio, Cleber Del Rey**, que estiveram sempre ao meu lado, enfrentando os desafios do dia a dia da pós graduação, tornando meus dias mais alegres. Muito obrigada pela ajuda e por compartilhar o conhecimento de vocês.

Ao grupo de Pesquisa da Professora Ana Paula Ramos

Sou muito grata aos alunos de pós-graduação e iniciação científica do laboratório Físico-química de Superfícies e Colóides do Departamento de Química da USP-Ribeirão Preto **Marcos Antônio Cruz, Larissa Tomazela, Lucas Bahia, Lucas Urbano, Tamires Maira, João Pedro Rezende e Guilherme Nogueira** por me receberem e me acolherem tão bem no laboratório, por toda a ajuda, por compartilhar conhecimentos e pela amizade.

Ao grupo de Pesquisa da Professora Roberta Okamoto

Aos alunos **Fábio Batista, Pedro Ferreira, Letícia Pitol, Ana Claudia Ervolino, Jaqueline Hassumi, Naara Monteiro, Paula Frigério, Jaqueline Silva, Gabriel Mulinari** muito obrigada pela amizade que temos desde a minha iniciação científica, pelo apoio, confiança, pelas risadas e pela ajuda que vocês me deram, na qual muitas vezes sacrificaram um pouco do tempo de vocês para me ajudarem nas cirurgia dos animais. Vocês são feras! Minha Gratidão!

Aos meus Familiares

Agradeço aos meus avós **Valdeci da Silva Costa, Miguel, Elzira Gargaro Yogui e Seiko Yogui** (*in memoriam*) pelo amor incondicional. Aos meus tios **Ademir Geski, Fátima Costa Geski, Luciene Costa, Mário Pavoni, Marlene Yogui, Lúcia Yogui, Sérgio, Agripino Costa e Maria Costa** por estarem sempre presentes e não medem esforços para me ajudar, e aos meus primos **Lucas Maeda, Bruno Maeda, Melina Mayumi, Melina Yonashiro, Letícia Pinhel, Viviene Pinhel, Cristiano Pinhel, Pedro Henrique Santos e Tamiris Santos** por todo o carinho e atenção. Amo muito vocês!

A **Ana Caroline Gonçalves Verri**, obrigada por sempre nos receber tão bem em sua casa e por todo apoio, e as princesinhas **Cecília** e a **Olívia**, que está para chegar, por alegrar e colorir as nossas vidas.

A Professora Doutora **Aimée Maria Guiotti**, por ter aceitado ser banca do meu Exame Geral de Qualificação, e ter contribuído muito para a melhoria do meu trabalho, obrigada pelo carinho e alegria no departamento, pela consideração, pela ajuda que você sempre me deu nas clínicas do Núcleo de ATM. Tenho imensa admiração por você. Muito obrigada professora!

Ao Professor **Aldieris Alves Pesqueira**, por ter aceitado ser minha banca do EGQ, e pelas excelentes contribuições neste trabalho. Professor, muito obrigada por estar sempre presente no departamento, tirar nossas dúvidas e sempre deixar o ambiente mais descontraído por onde você passa. Tenho imensa admiração e respeito por você.

As minhas amigas irmãs, **Clara Possarle, Natália Bachiega, Maria Paula Bernal, Brenda Marques e Olívia França**, que permitiram que a minha morada em Araçatuba fosse sempre agradável e alegre. Meus agradecimentos por todas as conversas, pelos jantares, pelas risadas, pela companhia. Amo vocês!

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, na pessoa de seu Diretor, **Prof Glauco Issamu Miyahara** e de seu vice-diretor, **Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem** pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado em Ciência Odontológica, na área de Biomateriais.

À **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP** por permitirem o desenvolvimento das superfícies, análises e experimentos. Agradeço ao **Rodrigo** do laboratório do MEV (FFCLRP), à **Elizabete** do laboratório de Microscopia Confocal (FMRP) e ao **José** e a **Marcia** do laboratório do scanner de Microscopia por fluorescência (FMRP) pela ajuda, gentileza e ensinamentos.

À **Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, por permitir a realização das análises de Densidade mineral óssea dos animais, e ao **Professor Mário Jefferson, Sr. Pedro** e **Rodrigo** do Departamento de Radiologia (FMVA) pela prontidão, atenção e assistência.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)** pela esterilização das minhas amostras. E ao doutor **Aljomar** que levou e buscou as minhas amostras no IPEN para me ajudar.

À **CAPES** e ao **CNPq** (130794/2019-8), pelo financiamento e apoio designado ao projeto de pesquisa através da concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos Professores **Eduardo Piza Pellizzer, Robson Frederico Cunha, Karina Helga Leal Turcio de Carvalho, Leonardo Perez Faverani, Américo de Oliveira, Joel Ferreira Santiago** por passarem pelas nossas vidas e deixar gravado em nos profundos ensinamentos pelo simples fato de amarem o que fazem, ser Professor!

A todos os funcionários do departamento de Materiais Dentários e Prótese, **Magda Requena, Eduardo Cobo, Carlos Alberto Gonçalves, Jander de Carvalho Inácio, Marco Antônio Requena, Dalete** pelo bom humor, por todo carinho e atenção que sempre me trataram, e por estarem sempre dispostos e disponíveis para nos ajudar.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela atenção, orientação e cordialidade.

Aos funcionários da Biblioteca: da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela colaboração e presteza em todos os momentos.

Àqueles que contribuíram ou participaram direta ou indiretamente da elaboração deste trabalho.

*“Não devemos permitir que alguém saia da nossa presença
sem se sentir melhor e mais feliz.”*

Madre Teresa de Calcutá

Yogui FCC. Caracterização e avaliação randomizada de superfícies de liga de titânio modificada por hidroxiapatita e hidroxiapatita incorporada com estrôncio em ratas saudáveis e osteoporóticas. [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

Resumo

Este estudo objetivou caracterizar os tratamentos de superfície com hidroxiapatita e hidroxiapatita modificada por estrôncio em duas concentrações (10 e 90%) sobre superfícies de liga de titânio, e avaliar a sua osseointegração em tíbias de ratas saudáveis e osteoporóticas. Foram utilizados parafusos de fixação e discos de liga de titânio, que foram divididos em grupos de acordo com a superfície: Usinada, Hap, HapSr 10% e HapSr 90%. Os tratamentos de superfícies foram realizados pelo método biomimético. Foi avaliado a morfologia, estrutura, composição química, molhabilidade, energia de superfície e integridade das superfícies. As superfícies também foram testadas *in vivo*, na qual os parafusos foram randomizados e instalados em tíbias de ratas saudáveis (controle) e osteoporóticas (OVX). A osseointegração foi avaliada pelo torque reverso, área de fluorocromos calceína e alizarina, área de contato entre tecido ósseo e parafuso e extensão linear de contato entre osso e parafuso 60 dias após a instalação. Nas análises laboratoriais observaram-se nas superfícies Hap, HapSr10% e HapSr90% filmes finos rugosos e presença de poros em escala nanométrica, presença de grupos químicos de Hap semelhante à do tecido ósseo, e aumento expressivo da molhabilidade e da energia de superfície. Nas análises *in vivo* de torque reverso, no grupo OVX os valores foram mais significativos para as superfícies contendo estrôncio (HapSr 10% e HapSr90%), enquanto no grupo controle a superfície de Hap apresentou maior torque para remoção do parafuso. A área de fluorocromos para calceína e a área óssea neoformada foi expressivamente maior na superfície de HapSr 10% do grupo controle. Em conclusão, as superfícies tratadas com as hidroxiapatitas melhoram a morfologia, composição e a reatividade da superfície, e apresentam um efeito promissor na osseointegração de parafusos em tíbias de ratas saudáveis e osteoporóticas.

Palavras-Chaves: Hidroxiapatita, estrôncio, osteoporose, implantes dentários, tratamento de superfície.

Yogui FCC. Characterization and randomized evaluation of titanium alloy surfaces modified by hydroxyapatite and hydroxyapatite incorporated with strontium in healthy and osteoporotic female rats. [Dissertation]. Araçatuba Dental School: UNESP - São Paulo State University; 2020.

Abstract

The objective of this study was to characterize the surface treatments with hydroxyapatite and hydroxyapatite modified by strontium in two concentrations (10 and 90%) on titanium alloy surfaces, and to evaluate their osseointegration in tibias of healthy and osteoporotic rats. Fixing screws and titanium alloy discs were used, which were divided into groups according to the surface: Machined, Hap, HapSr 10% and HapSr 90%. The surface treatments were carried out by the biomimetic method. The morphology, structure, chemical composition, wettability, free surface energy and surface integrity were evaluated. The surfaces were also tested in vivo, in which the screws were randomized and installed in the tibias of healthy (control) and osteoporotic (OVX) rats. Osseointegration was evaluated by reverse torque, area of fluorochromes calcein and alizarin, area of contact between bone tissue and screw and linear extent of contact between bone and screw 60 days after placement. Laboratory analyzes showed that Hap, HapSr10% and HapSr90% had thin, rough films and the presence of pores on a nanometer scale, the presence of Hap chemical groups similar to that of bone tissue, and a significant increase in wettability and surface energy. In the in vivo analyzes of reverse torque, in the OVX group the values were more significant for strontium-containing surfaces (HapSr 10% and HapSr90%), while in the control group the Hap surface showed greater torque for removing the screw. The fluorochromic area for calcein and the newly formed bone area were significantly greater on the HapSr 10% surface of the control group. In conclusion, surfaces treated with hydroxyapatites improve surface morphology, composition, and reactivity, and have a promoting effect on screw osseointegration in healthy and osteoporotic female rats.

Keywords: Hydroxyapatite, strontium, osteoporosis, dental implants, surface treatment.

Sumário

1. Introdução	13
2. Materiais e métodos	14
2.1 Caracterização das superfícies dos parafusos	17
2.1.1 Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)	17
2.1.2 Revestimento mineral	18
2.2 Armazenamento e esterilização	18
2.3 Análise das superfícies dos parafusos	19
2.4 Estudo <i>in vivo</i>	19
2.4.1 Integridade das superfícies tratadas	20
2.4.2 Cirurgia de Ovariectomia	20
2.4.3 Análise de Densidade Mineral Óssea	21
2.4.4 Cirurgia de instalação dos parafusos	22
2.4.5 Aplicação dos fluorocromos	23
2.5 Análises <i>in vivo</i>	23
2.5.1 Análise de torque reverso	24
2.5.2 Preparo do tecido calcificado	24
2.5.3 Microscopia confocal a laser	25
2.5.4 Escaneamento das lâminas em microscópio de fluorescência	25
2.6 Teste estatístico	26
3. Resultados	26
3.1 Análise da morfologia das superfícies modificadas	26
3.2 Análise da estrutura química	28
3.3 Análise de composição química	28
3.4 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície	29
3.5 Integridade da superfície	30
3.6 Análise de torque reverso	31
3.7 Análise da área de fluorocromos	32
3.8 Análise da área óssea neoformada	35
3.9 Análise da extensão de contato entre osso e parafuso	36
4. Discussão	37
Referências	41
Anexos	45

1. Introdução

O sucesso na reabilitação oral com implantes dentários é obtido pelo processo de osseointegração, pela conexão direta e estável entre o tecido ósseo e a superfície do implante (Branemark et al. 1984; Albrektsson e Lekholm, 1989). Nesse contexto, é necessário realizar um plano de tratamento adequado, uma boa técnica cirúrgica, que depende da curva de aprendizado do cirurgião, da escolha correta da geometria do implante para a área onde o implante será instalado e, finalmente, que esse implante apresente um tratamento de superfície para otimizar o tempo da osseointegração (Davies et al. 2013; Davies et al. 2014). Dessa forma, diferentes tipos de modificação da superfície foram propostos para melhorar as propriedades da superfície e induzir respostas biológicas mais favoráveis no tecido ósseo receptor.

A adição de biominais, como fosfato de cálcio nas superfícies de implantes de titânio na forma de um filme fino, causa alterações químicas, físicas e topográficas. Diferentes métodos podem ser usados para revestir superfícies metálicas com fosfatos de cálcio. Um dos métodos utilizados para o crescimento da hidroxiapatita (Hap) em superfícies metálicas é o método biomimético, que expõe a superfície em solução SBF (Simulated Body Fluid), que simula o pH e a composição iônica do fluido corporal, com base no processo de biomineralização natural, permitindo a precipitação de cristais Hap semelhantes ao processo in vivo (Kokubo et al, 1990; Kokubo, 1991).

O fosfato de cálcio é um dos principais biomateriais para substituição e regeneração do tecido ósseo devido à sua biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade e alta biodegradabilidade (de Faria et al. 2018). Um dos fosfatos de cálcio mais utilizados na produção de revestimentos ósseos é a Hap ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$), devido ao seu composto inorgânico estar presente em vários tecidos mineralizados (dentes e ossos), além disso, a estrutura cristalina da hidroxiapatita permite substituições iônicas e Ca pode ser substituído por metais como Pb^{2+} , Mg^{+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e Sr^{2+} (Ratnayake et al. 2017).

O estrôncio (Sr) é um elemento químico que possui muitas semelhanças com o cálcio (Ca), como absorção intestinal, incorporação no tecido ósseo, eliminação renal e alta afinidade pela hidroxiapatita. Devido à sua similaridade estrutural com cálcio, o organismo assimila e incorpora estrôncio nos tecidos e dentes ósseos (Blake e Fogelman, 2006). A semelhança química de Sr com íons Ca permite que ele seja um substituto dos fosfatos de cálcio e incorporado nas superfícies dos implantes de

titânio, a fim de promover a liberação local e controlada dos íons Sr^{2+} . A presença de Sr na interface osso/implante é promissora para a obtenção de biomateriais que exibem rápida osseointegração (Li Y et al. 2010). Estudos in vitro indicaram que a hidroxiapatita modificada por Sr aumentou a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Qiu et al. 2006).

Portanto, conhecendo as boas propriedades que Hap e Sr podem oferecer localmente no tecido ósseo, propõe-se avaliar o processo de osseointegração de implantes de titânio de superfície tratados com Hap modificado com Sr nas tíbias de ratas. Pensando também na qualidade do tecido ósseo receptor e nas vantagens que esse tratamento de superfície do implante pode oferecer, o osso que teria maiores benefícios seria um osso comprometido, com baixa densidade mineral óssea, como um osso osteoporótico. Neste contexto, as propostas deste trabalho são caracterizar superfícies de parafusos de liga de Ti com Hap e Hap modificado Sr em 10% e 90% e avaliar sua osseointegração em tíbias de ratas saudáveis e osteoporóticas, com o intuito de otimizar a ação local durante a osseointegração em condições sistêmicas desafiadoras. Tem-se como hipótese nula, em relação à caracterização de superfícies, que as superfícies usinadas, tratadas com Hap e Hap modificada por Sr, não apresentam diferenças nas propriedades químicas, físicas e morfológicas e, no estudo in vivo, não há diferença na o processo de osseointegração entre as superfícies usinadas, tratado com Hap e Hap modificada por Sr dos parafusos colocados nas tíbias de ratos saudáveis e osteoporóticos.

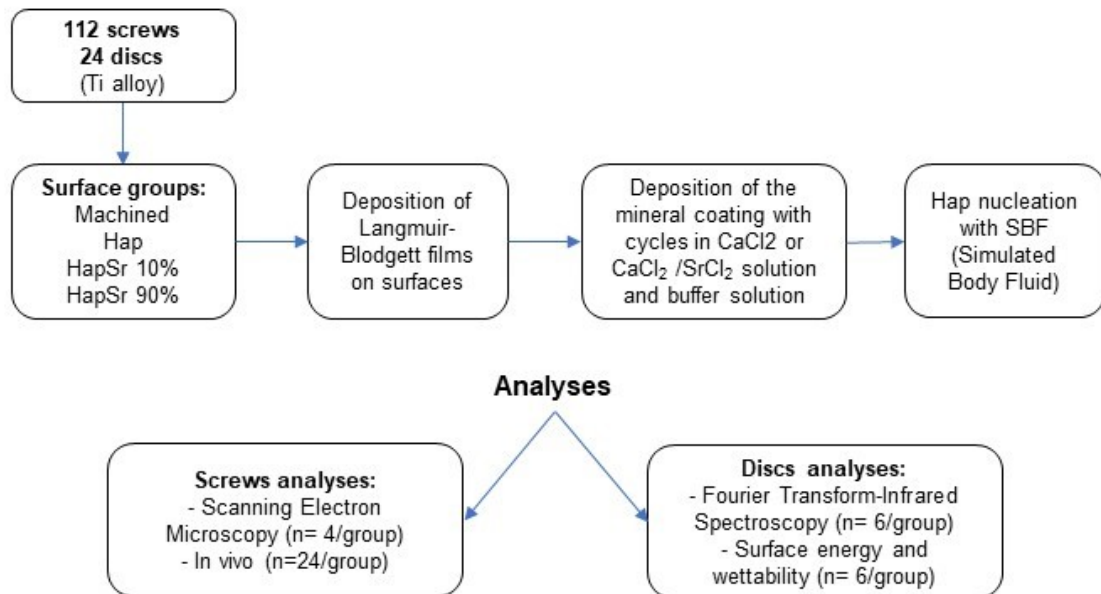
2. Materiais e Métodos

Este estudo avaliou comparativamente a caracterização de superfícies de parafusos de liga de Ti usinadas com superfícies tratadas com Hap e Hap modificada por Sr em concentrações de 10% e 90% e avaliou a osseointegração em tíbias de ratos saudáveis e osteoporóticos, como mostra o delineamento na Figura 1.

Fosfato de di-hexadecil (DHP), hidroximetil (Tris) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA. Cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio, hidróxido de sódio PA, fosfato de potássio monobásico anidro e os reagentes utilizados na preparação do SBF (cloreto de cálcio, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, fosfato de sódio dibásico, sulfato de sódio e tris-

hidroximetilaminometano) foram de grau analítico. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura Milli- Q®, livre de poeira.

Characterization of Ti alloy surfaces



In vivo study

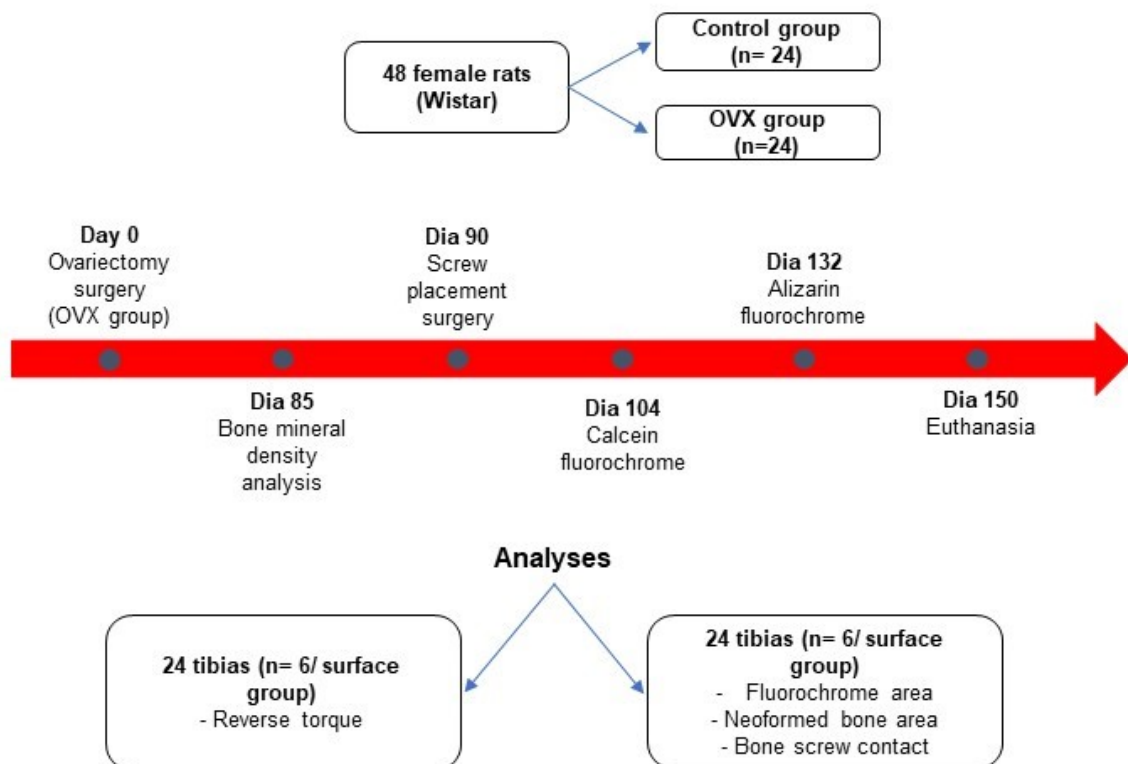


Fig. 1- Delineamento do estudo da caracterização das superfícies e do estudo *in vivo*.

2.1 Caracterização das superfícies dos parafusos

Inicialmente, os 128 parafusos de liga de titânio F136 (parafuso cortical cross driver de 1,5x4mm, Acciax produtos para saúde e correlatos LTDA, Mogi Guaçu - SP, Brasil), bem como os 24 discos de liga de Ti (discos de 10mm de diâmetro x 1,5mm de altura, Realum soluções em titânio e altas ligas, São Paulo, SP) foram submetidos a uma limpeza a plasma de baixa pressão com nitrogênio (Plasma Cleaner PDC - 32G, Harrick Plasma, Ithaca, Nova York, EUA) por três minutos, com o objetivo de limpar e ativar a superfície, tornando-a mais hidrofílica.

2.1.1 Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)

As isotermas de pressão superficial - área superficial (π - A) foram construídas a $25,0 \pm 0,5$ °C em uma cuba de Langmuir de 216 cm² (Insight - Brasil). Espalhou-se uma solução de 1,0 mmol L⁻¹ de dihexadecil fosfato (DHP) dissolvido em clorofórmio/metanol (3:1, v/v). O fosfolipídio foi espalhado em subfases contendo solução aquosa de 0,1 mmol L⁻¹ de CaCl₂ (grupo Hap) ou solução aquosa de CaCl₂/SrCl₂ (9:1, v/v - HapSr 10%) ou CaCl₂/SrCl₂ (1:9, v/v - HapSr 90%). Os íons cálcio e estrôncio foram incluídos nas soluções das subfases para promover a adesão entre as camadas fosfolipídicas da DHP nos filmes de LB e servir como fonte primária de íons Ca e Sr para o crescimento mineral.

As monocamadas foram transferidas para as superfícies de titânio (parafusos e discos) pela técnica LB. Os filmes de LB do tipo Y foram preparados imergindo inicialmente o suporte sólido na subfase contendo solução de CaCl₂ ou CaCl₂/CaSr₂ antes de espalhar a solução fosfolipídica. Foram realizados dois ciclos de descida das amostras, que iniciaram e terminaram os ciclos mergulhados no interior da monocamada. A pressão de deposição (pressão superficial) foi de 30 mN/m⁻¹. A velocidade da barreira foi de 0,42 mm/s e a velocidade de deposição (taxa de imersão/retirada) foi de 0,038 mm/s. Assim, na superfície dos parafusos, formaram filmes hidrofílicos com 4 camadas lipídicas, ou seja, 2 bicamadas lipídicas, terminando com o grupo hidrofílico, ou seja, com o grupo fosfato do DHP exposto na camada superior (de Souza et al. 2014) (Figura 2).

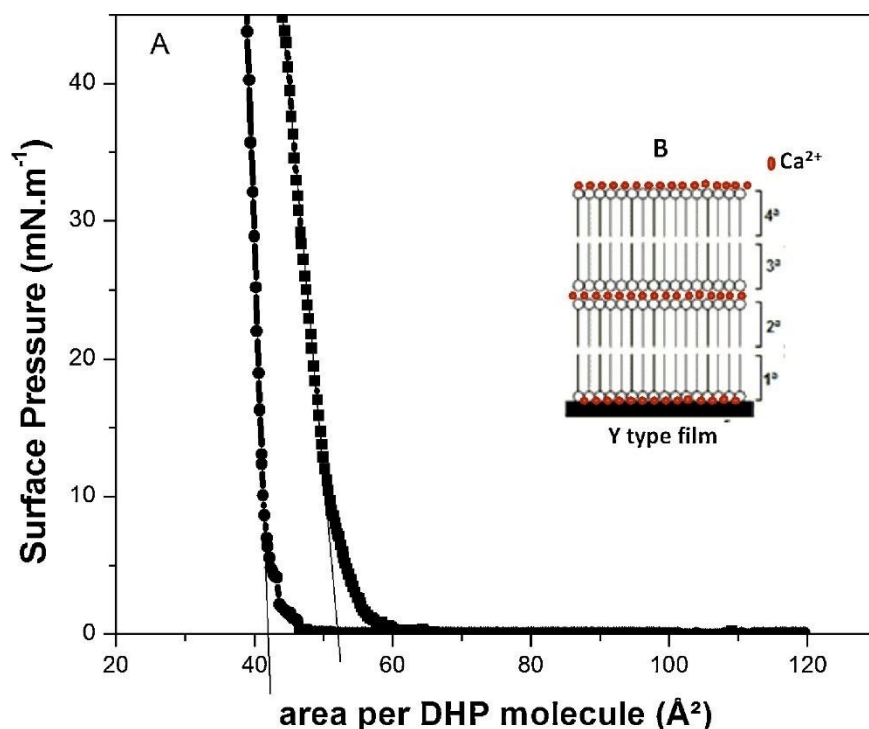


Fig.2 - A: Isotermas de pressão de superfície – área de superfície obtidos pelo DHP em água (quadrado) e em solução aquosa de CaCl₂. B: Representação esquemática do filme LB tipo Y, consistido em íons de DHP e Ca²⁺ (de Souza et al, 2014).

2.1.2 Revestimento mineral

Inicialmente, as superfícies de liga de Ti (modificadas com os filmes DHP-LB) foram imersas em uma solução aquosa de CaCl₂ ou CaCl₂/CaSr₂ por 12 h, e em solução tampão fosfato KH₂PO₄/NaOH (pH 7,5) por mais 12 h. Este ciclo de exposição ao Ca²⁺ e/ou Sr²⁺ / tampão fosfato e foi realizado três vezes consecutivas, para garantir a máxima ligação de íons às cargas negativas do fosfolipídio nos filmes LB e aumentar a supersaturação local na interface. Para o crescimento biomimético da Hap e Sr modificado com Sr, amostras com superfícies modificadas com filmes LB foram imersas em solução SBF (Simulated Body Fluid) a 37 °C por 24 hs (Kokubo e Takadama, 2006), este procedimento confere bioatividade da superfície, mimetizando a formação da camada de apatita em superfícies de materiais após a implantação *in vivo* (Ma J, et al. 2003). No final, as amostras foram submersas em milli Q® de água, secas com nitrogênio e armazenadas em eppendorfs.

2.2 Armazenamento e esterilização

Todos os parafusos foram armazenados em eppendorfs e os grupos foram identificados genericamente como G1, G2, G3 e G4 para haver o cegamento dos

avaliadores e reduzir o risco de viés, apenas um autor teve o conhecimento da identificação das amostras. As amostras foram esterilizadas no Irradiador Multipropósito de ^{60}Co em uma dose de 25kGy no IPEN (Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo - SP).

2.3 Análise das superfícies dos parafusos

Para a análise da morfologia da superfície, as amostras foram recobertas com um filme fino de ouro e analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SuperScan SS-550, Shimadzu Corporation, Japan). A razão molar de Sr e/ou Ca/P nos filmes sobre a superfície foi avaliada pela técnica de espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX) (espectrômetro IXRF system 500 Digital Processing). Os grupos químicos foram identificados pela espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no aparelho de reflexão total atenuada (Shimadzu Prestige - 21). A molhabilidade e a energia livre de superfície das amostras foram determinadas pela medição dos ângulos de contato (θ) (DataPhysics OCA20) dos líquidos de teste (água, diiodometano e formamida) nas superfícies metálicas antes e depois das modificações, usando o Equação de Owens – Wendt – Kaelble (Owens e Wendt, 1969):

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_L^d \times \gamma_S^d)^{1/2} + 2(\gamma_L^p \times \gamma_S^p)^{1/2}$$

Onde S e L representam as superfícies sólida e líquida, respectivamente, e γ^d e γ^p correspondem ao componente dispersivo e polar da energia total da superfície (γ), respectivamente.

2.4 Estudo *in vivo*

Após a aprovação do comitê de ética em pesquisa no uso de animais (CEUA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Processo FOA nº 00384-2018) (Anexo1), , 48 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas, jovens (3-4 meses), com peso corporal entre 250 e 300g foram utilizadas. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e alimentados com ração sólida (Labina Presence ratos e camundongos, Paulínia-SP) e água “ad Libitum”,

durante todo o experimento. As ratas foram divididas em dois grupos: Controle (ratas saudáveis) e OVX (ratas osteoporóticas) (Figura 1).

2.4.1 Integridade das superfícies tratadas

Para análise da integridade das superfícies dos parafusos, 2 parafusos com superfície de Hap foram instalados nas tíbias direita e esquerda de 1 rata, removidos e avaliados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A cirurgia de instalação dos parafusos foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito abaixo no tópico “cirurgia de instalação dos parafusos”. Após os parafusos instalados nas tíbias, foi realizada a eutanásia do animal por sobredosagem anestésica com tiopental sódico 1g (Thiopentax, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo – SP) e assim, os parafusos foram removidos, submersos em água milli Q, secados e armazenados em eppendorfs. Foram analisados os parafusos com superfície usinada, superfície modificada por Hap e as superfícies dos parafusos de superfície modificada com Hap após instalações em tíbia de ratas. As amostras foram revestidas em ouro e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens das superfícies dos parafusos foram capturadas e salvas em formato TIF em aumentos originais de 60, 1000 e 10000x.

2.4.2 Cirurgia de Ovariectomia

Para a indução da osteoporose nos animais foi realizada a cirurgia de ovariectomia (Yousefzadeh N et al 2020). Para tanto, 24 ratas Wistar, fêmeas, jovens, 4 meses de idade, foram mantidas em jejum por 12 horas. Inicialmente as ratas foram pesadas e anestesiadas por via intramuscular com a combinação de 0,35ml/kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Anesedan, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia - SP) e 0,8ml/kg de Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia - SP). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região lateral direita do abdômen das ratas, e a antisepsia da região com Iodopovidona 10% (Riodeine Dermo Suave Tópico, Rio química Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto – SP).

O tecido cutâneo foi pinçado com uma pinça Dietrich e cortado com uma tesoura metzembaum, o mesmo foi feito com os tecidos adiposo e muscular até o acesso a cavidade abdominal para a exposição das trompas uterinas e ovários. Com

os órgãos reprodutores expostos, foi realizado a laqueadura das trompas uterinas direita e esquerda com fio de nylon 4.0 (Shalon Fios de Sutura Ltda, São Luís de Montes Belos – GO) e após isso, a remoção dos dois ovários. A sutura foi feita por planos (muscular, adiposo e cutâneo). Ao final da cirurgia foi aplicado 0,2ml de pentabiótico 2.400.000 UI (Zoetis Indústria de Produtos veterinários Ltda, Brasil) por via intramuscular e realizado outra antissepsia com Iodopovidina 10%.

2.4.3 Análise de Densidade Mineral Óssea

Foi realizada a densidade mineral óssea (DMO) das tíbias e dos fêmures de uma amostra dos grupos Controle (n=6 ratas) e OVX (n=6 ratas) para avaliar se houve diminuição da massa óssea após 3 meses de ovariectomia (ratas com 6-7 meses de idade). Para tanto, os animais foram anestesiados com combinação de quetamina e xilazina e posicionados de decúbito ventral no densitômetro ósseo (DPX alfa), e realizado a absorciometria de dupla energia de raios X (DEXA) da região de fêmur e tíbia. No software (Lunar Excellence in imaging) obteve-se os valores da DMO a partir das imagens do DEXA. A análise estatística foi realizada pelo programa SigmaPlot 12.0 e os dados foram submetidos ao test-t (comparação entre 2 grupos) e ao teste de normalidade Shapiro-Wilk com nível de significância de 5%.

Pelas imagens do DEXA é possível observar maior radiolucidez nas metáfises tibiais no grupo OVX o que sugere uma menor massa óssea nesta região, outra diferença notável é a curvatura no osso da tíbia neste grupo (Figura 3, A).

As alterações observadas no exame de imagem são confirmadas pela densidade mineral óssea (DMO), com uma diminuição significativa da DMO nas tíbias no grupo OVX ($0,112 \pm 0,0273 \text{ g/cm}^2$) comparado ao grupo controle ($0,154 \pm 0,0148 \text{ g/cm}^2$) (test-t, $p=0,013$). A análise da DMO do fêmur o grupo OVX ($0,161 \pm 0,0346 \text{ g/cm}^2$) também apresentou menor densidade, com significância estatística em relação ao controle ($0,211 \pm 0,0280 \text{ g/cm}^2$) (test-t, $p=0,028$) (Figura 3, B). Dessa forma, foi comprovada a osteoporose nos animais do grupo OVX e então foi realizada a cirurgia de instalação dos parafusos nas tíbias.

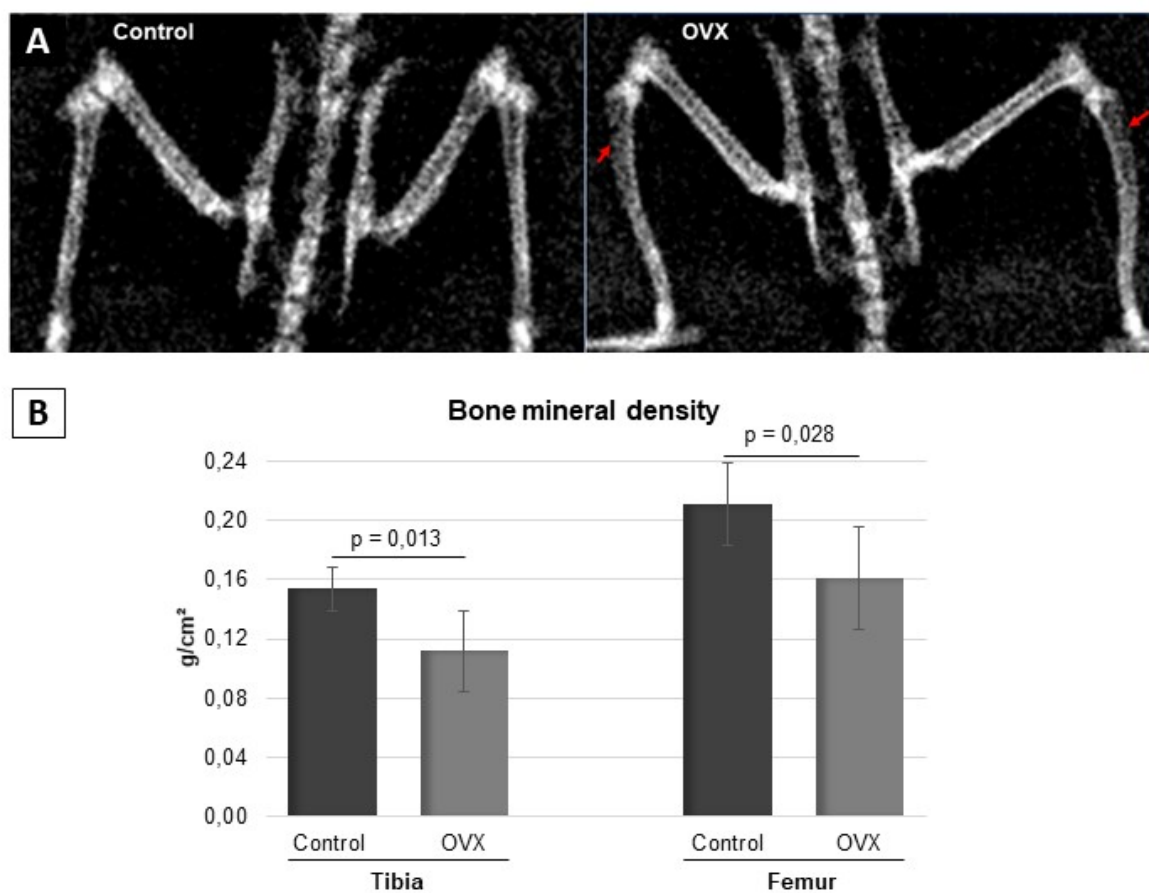


Fig. 3 – A: Imagem do DEXA do grupo controle e OVX; B: Média e desvio padrão da DMO da tíbia e do fêmur nos grupos controle e OVX.

2.4.4 Cirurgia de instalação dos parafusos

Após 3 meses da ovariectomia, todos os animais foram submetidos a cirurgia de instalação dos parafusos. Os parafusos identificados genericamente de G1-G4, randomizados com o auxílio do programa research randomizer (<https://www.randomizer.org/>), e a instalação dos parafusos nas tíbias direita e esquerda de cada animal dos grupos controle e OVX seguiu a ordem da randomização, de modo que os operadores não tiveram conhecimento do tratamento de superfície. As identificações dos grupos dos parafusos instalados foram feitas nas orelhas de cada animal.

Após jejum de 12 horas, as animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular com a combinação de Cloridrato de Xilazina 2% e de Cloridrato de Cetamina 10% e na região da metáfise tibial foi injetado Cloridrato de Mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre, Fábrica DFL Indústria e Comércio, Rio de Janeiro - RJ) para anestesia local e hemostasia da área operatória. Após a anestesia,

foi realizado a tricotomia da região lateral externa das tíbias direita e esquerda, a antissepsia da região a ser incisada foi realizada com Iodopovidona 10%. Com auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Solidor, Labor Import. Com. Imp. Exp. Ltda, Osasco - SP), foram feitas as incisões de aproximadamente 2cm na região da metáfise tibial, a seguir, o tecido mole foi divulsionado e afastado para exposição do sítio cirúrgico. Após a exposição da metáfise tibial, foi realizada a fresagem de 4mm na porção proximal da tibia com broca 1.3 (Acciax Usinagem Mecânica Ltda EPP, Mogi Guaçu - SP), acoplado ao contra ângulo com redução de 20:1 (NSK) montado em motor elétrico a uma velocidade de 900 rpm, e sob irrigação de solução isotônica de cloreto de sódio 0,9%. Os parafusos com os diferentes tratamentos de superfície foram instalados manualmente com auxílio de uma chave 1.5 (Acciax Usinagem Mecânica Ltda EPP, Mogi Guaçu - SP). A sutura foi feita em planos (muscular e cutâneo). Após a cirurgia os animais receberam por via intramuscular 0,2ml de pentabiótico 2.400.000 UI e foi realizada outra antissepsia com Iodopovidona 10% na região cirúrgica.

2.4.5 Aplicação dos fluorocromos

Para a análise dos fluorocromos, aos 14 dias após a instalação dos parafusos foi administrado pela via intramuscular, 20mg/kg do fluorocromo Calceína e após mais 28 dias (42 dias após a instalação dos implantes), foi administrado o fluorocromo vermelho de alizarina, na dose de 20 mg/kg para cada animal (Ramalho-Ferreira et al., 2015). A eutanásia destes animais foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes (18 dias após a administração da alizarina).

2.5 Análises *in vivo*

Passados 60 dias da instalação dos implantes, foi realizada a eutanásia dos animais com sobredosagem anestésica com tiopental sódico 1g (Thiopentax, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo – SP). Seis tíbias de cada grupo de tratamento de superfície dos grupos Controle e OVX foram submetidos a análise de torque reverso, enquanto as outras seis tíbias de cada grupo de tratamento de superfície dos animais Controle e OVX foram armazenadas em solução formalina para posterior análise dos tecidos calcificados.

2.5.1 Análise de torque reverso

Após a eutanásia as tíbias foram novamente incisadas, para a exposição dos parafusos. O contra- toque foi feito com o auxílio de uma ponta de chave 1.5 de haste longa (acciax) acoplado a um torquímetro digital. A Análise foi realizada por um operador calibrado, o qual aplicou um movimento anti-horário único até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, o pico máximo de torque para o rompimento registrado pelo torquímetro, dado em Newton por centímetro (N.cm) foi anotado.

2.5.2 Preparo do tecido calcificado

As tíbias foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e lavadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100%, gradativamente, com troca de solução a cada 7 dias, ao término da desidratação, as peças foram imersas em solução de álcool 100% e acetona PA, acetona, acetona e metilmetracrilato MMAL (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) em proporção de 1:1. Seguido de banhos de metilmetracrilato e o peróxido de benzoíla (1%, Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover, Germany) foi adicionado no último banho. As amostras foram inseridas em tubos de vidro e mantidos em estufa (Cienlab, Equipamentos Científicos Ltda, Campinas, SP, Brasil) à uma temperatura de 37° por 7 dias até a polimerização completa da resina.

Os blocos de resina contendo as amostras foram removidos dos tubos após a polimerização. Os blocos foram reduzidos seguindo o longo eixo do plano sagital das tíbias. O desgaste ocorreu com broca “Maxcut” acoplada em motor elétrico (Strong 210, São Paulo, SP, Brazil). As amostras foram submetidas a um progressivo desgaste manual em politriz (ECOMET 250PRO/AUTOMET 250, Buchler, Lake Bluff, Illinois) com lixas d’água (Granulações de 150, 320, 600 e 1200; 3M, Brasil) até uma espessura entre 100 - 80 µm.

Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas imersos em óleo mineral (Petrolato Líquido, Maantecor, Taquara, RJ, Brazil). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal e escaneadas por um microscópio de fluorescência.

2.5.3 Microscopia confocal a laser

Para a análise da área dos fluorocromos precipitado aos 14 dias após a instalação dos parafusos com calceína e aos 42 dias com vermelho de alizarina, bem como o overlay, presença dos 2 fluorocromos, as lâminas foram submetidas a análise por microscopia confocal a laser.

Foi realizado o escaneamento longitudinal das amostras com os parafusos no microscópio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), usando objetiva 10x, acoplado em um computador, e o programa utilizado foi a LAS AF. A área avaliada foi a porção do osso medular junto ao parafuso.

As imagens foram obtidas em 27 cortes, com fatias de 2 μm de espessura, as imagens tiveram a dimensão de 1x1 mm^2 , correspondente a imagens de 512 pixels (1,953125 $\mu\text{m}/\text{pixel}$), os cortes foram escaneados por 3 minutos. Para a Calceína foi configurada/padronizada a excitação em 488nm e a detecção em 534 (faixa de detecção entre 510 – 550nm) e para a Alizarina a excitação foi de 543nm e a detecção em 627 (577 – 580nm).

As imagens foram reconstruídas pela junção dos cortes no programa Image J e salvas em jpeg. A intensidade dos fluorocromos Calceína, Alizarina e overlay (sobreposição dos 2 fluorocromos) foram quantificadas com o auxílio do Programa Image J.

2.5.4 Escaneamento das lâminas em microscópio de fluorescência

As mesmas lâminas analisadas pelo microscópio confocal também foram escaneadas no microscópio Olympus BX61VS acoplado a um computador, na qual foi usado o programa Olympus (VS-ASW FL 2.27, Olympus Corporation) para a obtenção das imagens.

A partir das imagens, no programa Image J, foi aplicado a ferramenta threshold e delimitada a área óssea neoformada junto ao parafuso e mensurado a área de contato entre osso e parafuso em um dos lados do parafuso, na porção de osso medular (regiões das duas espiras mais centrais do parafuso) devido à anatomia do leito receptor (espaço medular amplo ser mais crítico ao processo de neoformação e remodelação), à semelhança da metodologia de Ramalho-Ferreira et al. (2015).

2.6 Teste estatístico

Os dados das análises de molhabilidade, energia livre de superfície, torque reverso, área de fluorocromos, área óssea neoformada e área de contato entre osso e parafuso foram tabulados e a estatística foi realizada no programa Sigma Plot 12.0, com a análise de variância One way anova, teste de normalidade de Shapiro-Wilk e quando necessário, foi usado o pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos.

3 Resultados

3.1 Análise da morfologia das superfícies modificadas

A partir das imagens do MEV na Figura 4 é possível observar a superfície usinada (Fig. 4, A e B) com presença de leves ranhuras, listras formadas devido ao processo de usinagem. As superfícies tratadas com Hap, foi possível observar dois padrões de morfologia, nas imagens (Fig. 4, C e E) observou-se a formação de filmes finos de Hap na escala nanométrica, com características de rugosidade e presença de poros, estas características também são evidenciadas em Fig. 4, D e F, porém de forma mais intensa, com a visualização de nanopartículas de Hap, isso ocorreu devido a maior precipitação de minerais em algumas regiões do parafuso. As superfícies modificadas com HapSr10% (Fig. 4, G e H) e HapSr90% (Fig. 4, I e J) apresentaram morfologia mais semelhante aos filmes de Hap (Fig. 4, C e E) com a características de filmes finos, porém com rugosidade e poros mais evidentes.

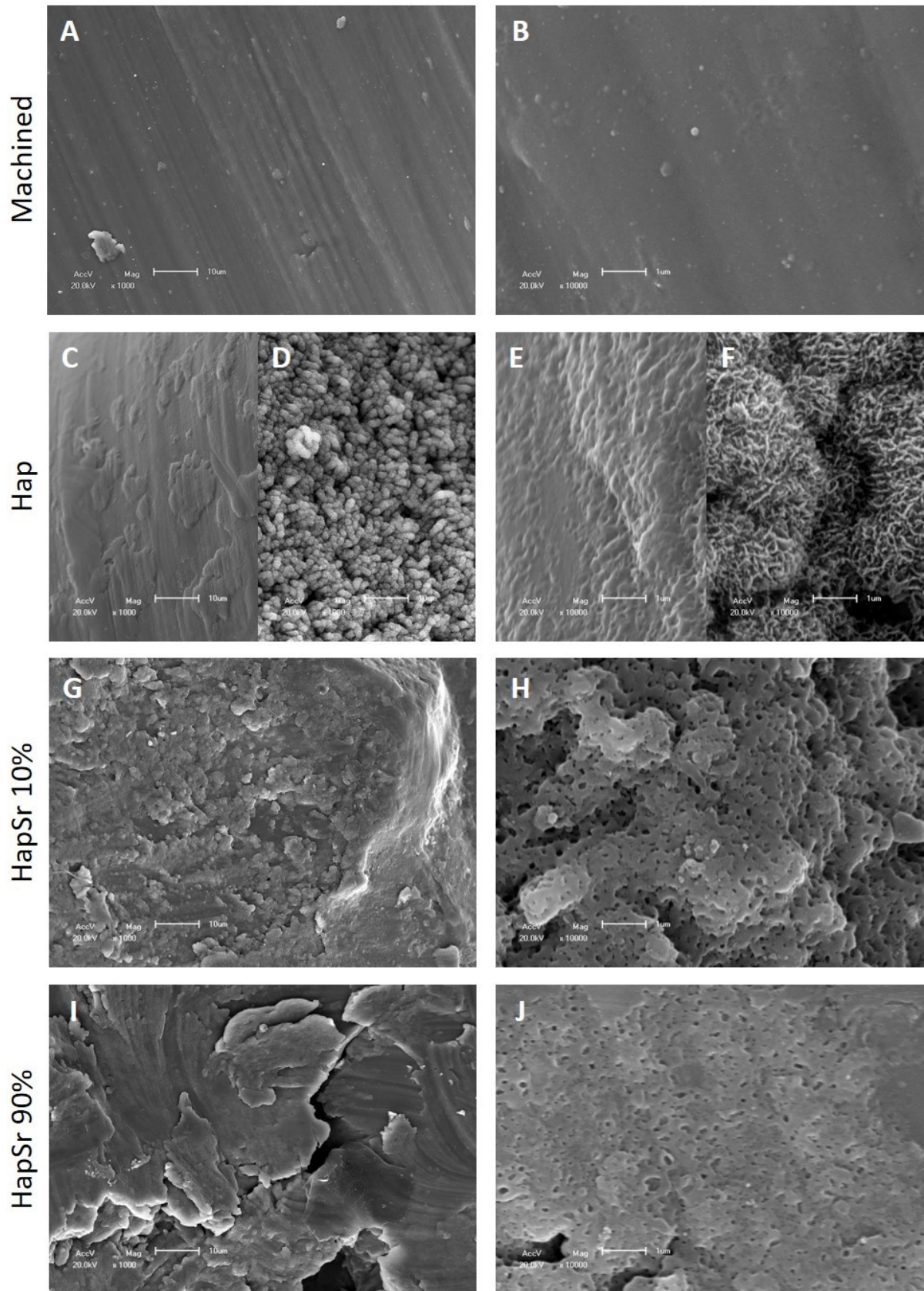


Fig. 4 - Fotomicrografias obtidas a partir da MEV das superfícies dos parafusos de superfície usinada (A e B) e modificadas com Hap (C, D, E e F), HapSr 10% (G e H) e HapSr 90% (I e J). Aumento original de 1.000x (A, C, D, G e I) e 10.000x (B, E, F, H e J).

3.2 Análise da estrutura química

Na análise de estrutura química pelo espectro de absorção do infravermelho sobre a superfície dos discos tratados (Fig. 5), pode-se observar a presença de hidroxiapatita carbonatadas nas bandas entre 1800 e 1300 cm^{-1} , presença do grupo fosfato (PO_4) na região de pico de 1000 cm^{-1} , e na banda entre 2800 e 3000 cm^{-1} presença do componente orgânico (DHP).

É importante destacar que a estrutura química da hidroxiapatita das superfícies tratadas apresentou semelhança com a estrutura da hidroxiapatita do tecido ósseo (de Souza et al. 2014) (Fig. 5).

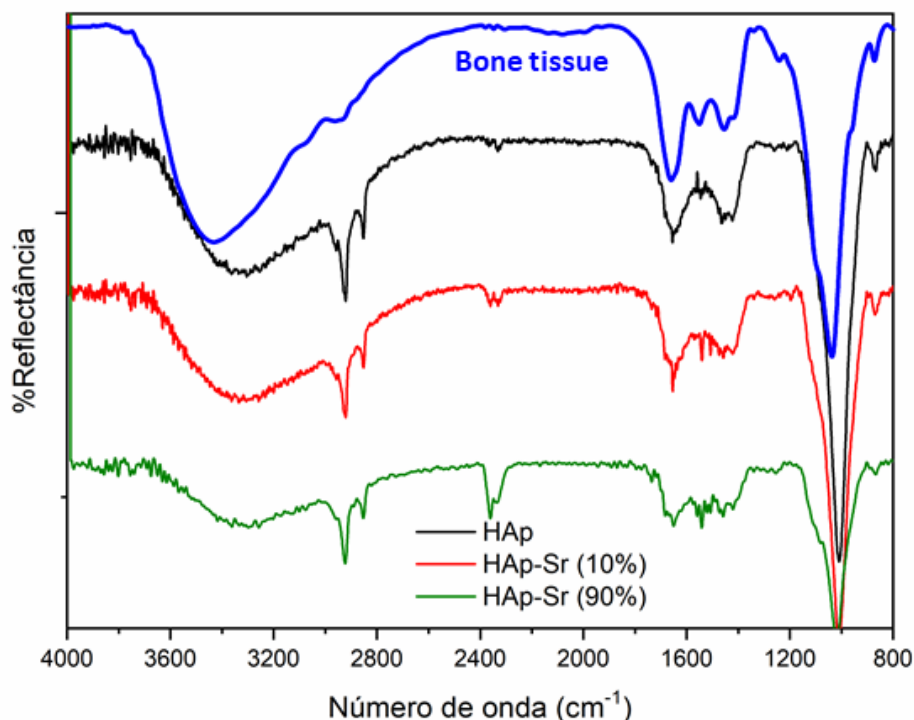


Fig. 5 - Espectros de absorção na região do infravermelho (ATR-FTIR) do tecido ósseo e das superfícies de titânio modificadas com HAp, HapSr 10% e HapSr 90%.

3.3 Análise de composição química

Na análise de composição química, para verificação de P, Ca e Sr (Fig. 6), todos os grupos tratados com as apatitas apresentaram uma ótima relação de Ca/P, que deve ser de 2:1. Entretanto, houve uma baixa concentração de Sr tanto no grupo HapSr10% como no HapSr90%, isso pode ter ocorrido devido ao Sr^{2+} estar incorporado à parte polar dos filmes LB de DHP assim como o Ca^{2+} , e estar oculto pela Hap formada após a exposição da superfície em SBF. Vale ressaltar que o Sr, mesmo apresentando-se de forma discreta na superfície, pode desempenhar um importante papel na formação óssea caso sua liberação seja lenta no organismo *in*

vivo, ou seja, conforme a Hap é reabsorvida pelo organismo, o Sr é liberado aos tecidos (ação local).

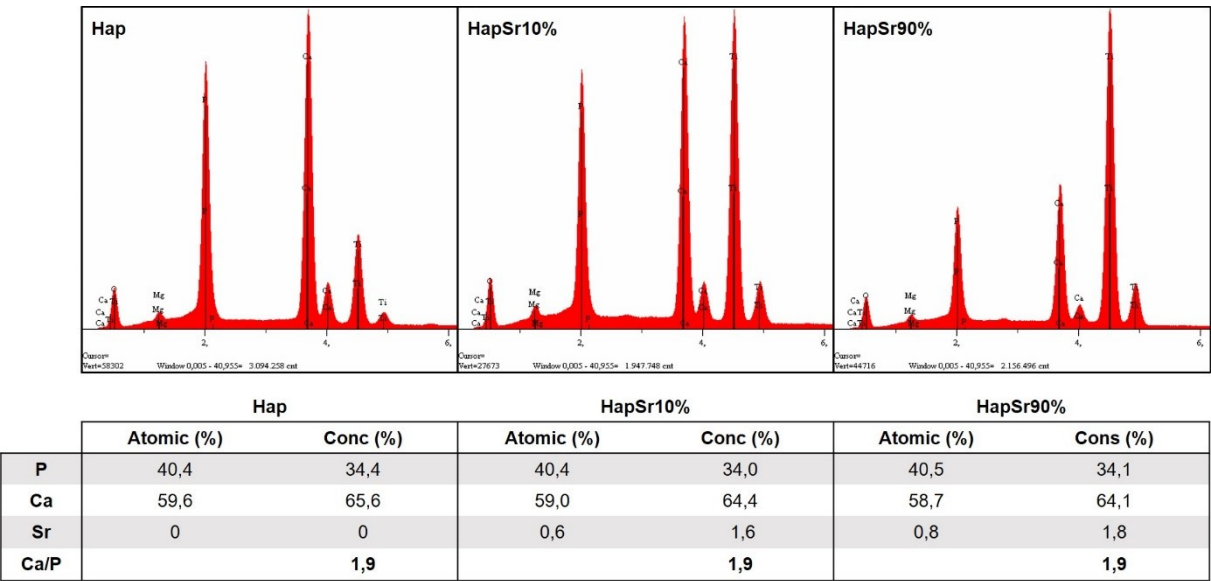


Fig. 6- Imagens e valores do EDX para os elementos P, Ca, Sr e a razão entre Ca/P nos grupos experimentais Hap, Hap-Sr10% e Hap-Sr90%. Amostras: Discos de Ti com superfície modificada.

3.4 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

A molhabilidade das superfícies usinadas e das superfícies tratadas com as apatitas foram avaliadas por medidas de ângulo de contato (θ) entre as superfícies e as gotas de água. Como mostrado na (Fig. 7), a modificação das superfícies de liga Ti com apatitas alterou suas propriedades superficiais. Observou-se considerável aumento da hidrofilicidade das superfícies após as modificações com Hap, HapSr10% e HapSr90% (diminuição do θ da água) e aumento significativo da energia livre de superfície (SE) (Tukey test, $p>0,001$).

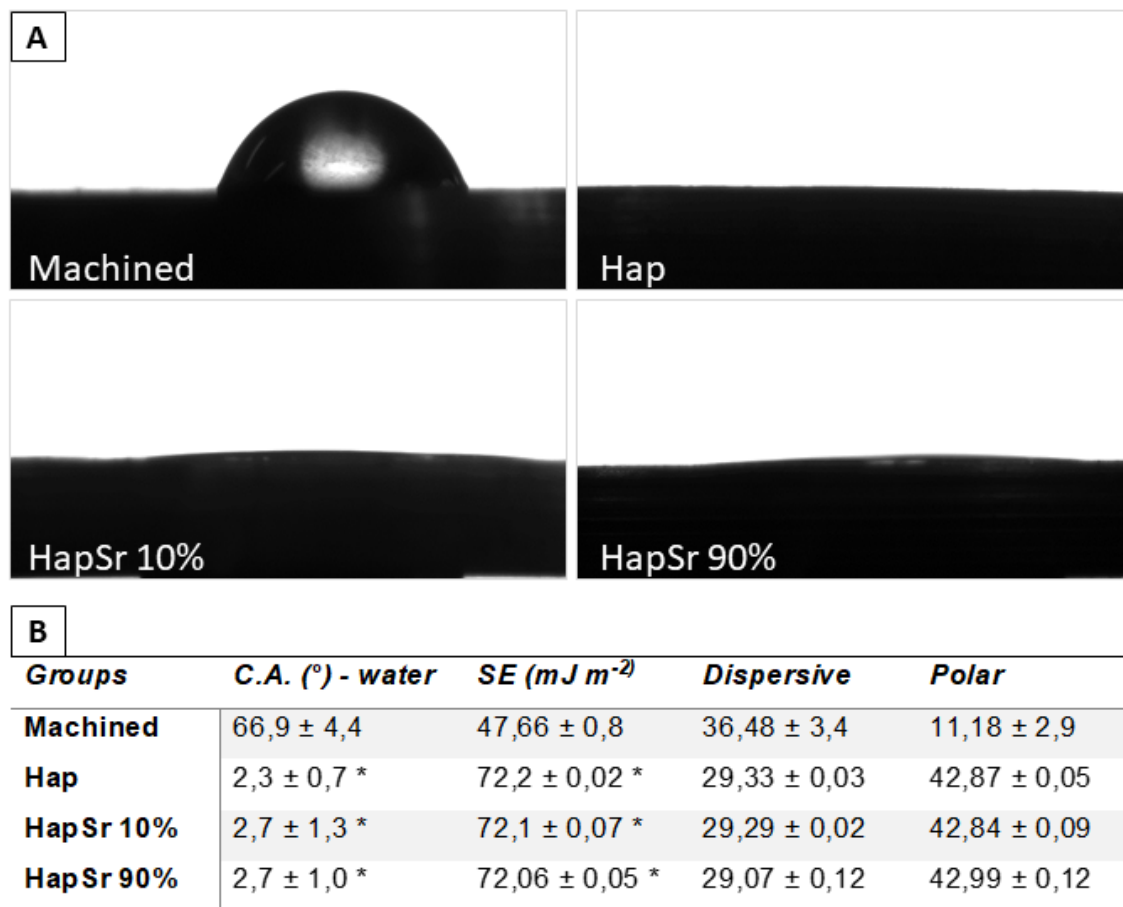


Fig. 7 – A: Ângulo de contato formado entre a gota de água e as superfícies usinada, Hap, HapSr 10% e HapSr 90%. B: Ângulo de contato (C.A.) entre as gotas e as superfícies usinadas e modificadas com as apatitas e respectivos seus valores de energia livre de superfície (SE). (*) Diferença estatística de $p < 0,001$ quando comparado à S. usinada.

3.5 Integridade da superfície

É importante relatar que durante a remoção dos parafusos das tíbias, aqueles com superfície tratada com Hap apresentaram grande quantidade de coágulo sanguíneo aderido à sua superfície, o que não aconteceu nos parafusos sem tratamento (usinados), o que permite observar que a superfície com Hap apresentou característica hidrofílica, maior interação dos fluidos corporais com a superfície, e passível de um processo de osteogênese de contato.

A partir das imagens do MEV é possível analisar a superfície usinada (Fig. 8, A, D e G) com presença de leves ranhuras, listras formadas devido ao processo de usinagem. Nas superfícies dos parafusos tratados com Hap (Fig. 8, B, E e H) observa-se a presença dos filmes de LB (Fig. 8, E), filmes nanométricos de Hap (nano-Hap) com características de rugosidade e presença de poros (Fig. 8, H). Nas superfícies dos parafusos tratados com Hap após instalados nas tíbias (Fig. 8, C, F e I) pode-se

afirmar que houve grande quantidade de coágulo sanguíneo aderido à superfície (Fig.8, C), não houve alteração nos filmes de Hap (Fig.8, F), além disso, houve um recobrimento de fluido corporal sobre os poros das nano camadas de Hap (Fig. 8, I). Assim pode-se afirmar que o atrito de inserção do parafuso no osso não removeu o revestimento de Hap da superfície.

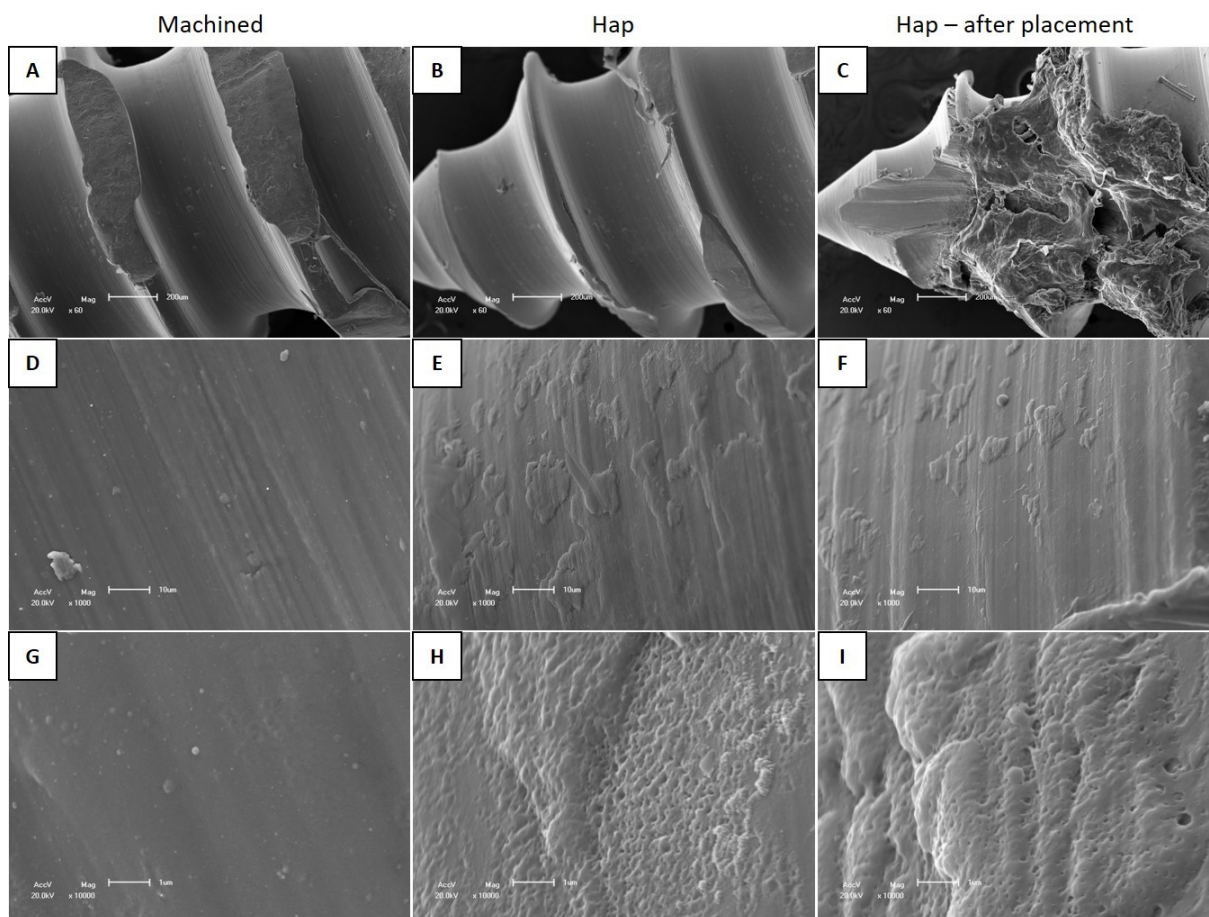


Fig. 8- Fotomicrografias obtidas a partir dos parafusos de superfície usinada (A, D, G); superfície modificada com Hap (B, E, H) e superfície modificada com Hap após instalação em osso (C, F, I). Aumento original de 60x (A, B, C); 1000x (D, E, F); 10000x (G, H, I).

3.6 Análise de torque reverso

Na análise biomecânica, no grupo controle o tratamento de superfície de Hap ($3,96 \pm 0,62$ N.cm) apresentou o maior torque para a remoção do parafuso, seguido da superfície de HapSr 10% ($3,5 \pm 0,72$ N.cm), HapSr 90% ($2,8 \pm 0,45$ N.cm) e o menor torque reverso foi na superfície usinada ($2,7 \pm 0,26$ N.cm). O torque reverso da superfície de Hap foi significativamente maior que as superfícies usinada (Tukey test, $p = 0,023$) e HapSr 90% (Tukey test, $p = 0,046$) (gráfico 1).

No grupo OVX, a superfície que apresentou a maior torque reverso do parafuso foi a de HapSr 90% ($4,4 \pm 0,63$ N.cm), seguido pelas superfícies de HapSr 10% ($4,32$

$\pm 0,46$ N.cm) e Hap ($3,89 \pm 0,69$ N.cm), a superfície usinada ($3,12 \pm 0,694$ N.cm), assim como no grupo controle, foi a que apresentou menor torque reverso. As superfícies de HapSr 10% e HapSr 90% mostraram-se superior à superfície usinada com significância estatística (Tukey test, $p = 0,025$ e $p = 0,02$ respectivamente) (gráfico 1).

Na relação entre grupos, o grupo OVX com os tratamentos de HapSr 10 e 90% apresentaram maiores torques reversos que nas superfícies usinada e HapSr 90% do grupo controle.

É interessante notar que o grupo OVX com os tratamentos de superfícies de apatitas com Sr teve melhores resultados que as mesmas superfícies no grupo controle.

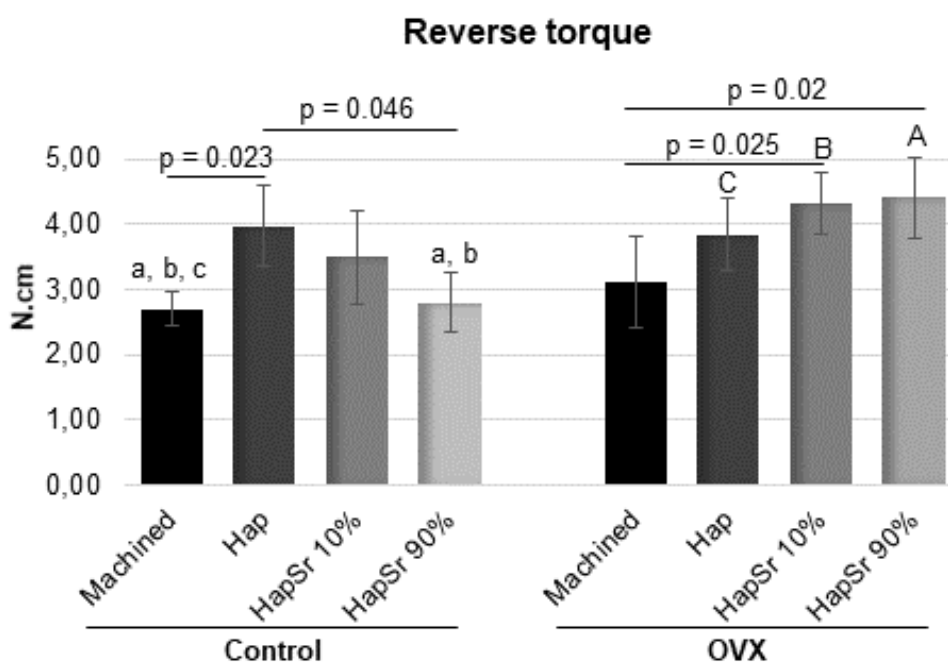


Gráfico 1 – Valores das médias e desvios padrão do torque reverso das superfícies nos grupos controle e OVX aos 60 dias após instalação do implante; a: diferença estatística com OVX – HapSr 90% (Tukey test, $p < 0,05$); b: diferença estatística com OVX – HapSr 10% (Tukey test, $p < 0,05$); c: diferença estatística com OVX – Hap (Tukey test, $p < 0,05$).

3.7 Análise da área de fluorocromos

Nas imagens dos fluorocromos por microscopia confocal podemos observar no grupo controle uma atividade óssea mais intensa do que as respectivas imagens das superfícies no grupo OVX. No grupo controle houve maior intensidade de calceína nas superfícies contendo estrôncio, enquanto no grupo OVX houve maior intensidade nas superfícies tratadas (Fig. 9).

Na análise da área de fluorocromos, no grupo controle, a superfície de HapSr 10% apresentou a maior média de overlay ($26830,20 \pm 8806,88 \mu\text{m}^2$), no qual o fluorocromo calceína ($20362,60 \pm 9563,49 \mu\text{m}^2$) foi significativamente mais precipitado no tecido ósseo periimplantar do que o fluorocromo alizarina ($8049,20 \pm 582,17 \mu\text{m}^2$), (Tukey test, $p = 0,014$). A segunda maior média para overlay foi na HapSr 90% ($20189,60 \pm 7938,12 \mu\text{m}^2$), também com predominância de calceína ($12042,60 \pm 6967,00 \mu\text{m}^2$) em relação a alizarina ($9393,40 \pm 1878,72 \mu\text{m}^2$). A superfície de Hap teve um overlay menos intenso que as superfícies de apatitas com Sr ($18111,00 \pm 3269,27 \mu\text{m}^2$) e houve uma ligeira precipitação a mais de calceína ($9973,60 \pm 4400,91 \mu\text{m}^2$) do que de alizarina ($9270,80 \pm 1255,65 \mu\text{m}^2$). O menor overlay foi na superfície usinada ($14090,25 \pm 5233,83 \mu\text{m}^2$), que apresentou menor deposição de calceína ($9643,50 \pm 6154,97 \mu\text{m}^2$) em relação à alizarina ($7873,50 \pm 2496,94 \mu\text{m}^2$). A precipitação do fluorocromo calceína na região periimplantar da superfície HapSr 10% foi significativamente maior que na usinada no grupo controle (Tukey test, $p = 0,011$) (Gráfico 2).

No grupo OVX, o maior valor médio de intensidade para o overlay foi na superfície HapSr 10% ($16728,60 \pm 6717,31 \mu\text{m}^2$) com uma leve intensidade a mais de calceína ($8912,00 \pm 5978,86 \mu\text{m}^2$) do que alizarina ($8645,40 \pm 2213,67 \mu\text{m}^2$). O segundo maior overlay foi na HapSr 90% ($16243,60 \pm 3672,09 \mu\text{m}^2$), também com ligeira intensidade a mais de calceína ($8617,60 \pm 4316,67 \mu\text{m}^2$) em relação a alizarina ($8382,80 \pm 1031,49 \mu\text{m}^2$). O overlay da superfície de Hap ($15833,40 \pm 6665,83 \mu\text{m}^2$) mostrou-se levemente inferior que as superfícies tratadas com hidroxiapatitas e Sr, e apresentou maior precipitação de calceína ($9064,80 \pm 7128,19 \mu\text{m}^2$) que alizarina ($7553,80 \pm 750,75 \mu\text{m}^2$). A superfície usinada foi a que teve menor precipitação de fluorocromos (overlay: $13955,00 \pm 1966,69 \mu\text{m}^2$), com menor precipitação de calceína ($6332,33 \pm 2585,00 \mu\text{m}^2$) que alizarina ($8190,00 \pm 708,87 \mu\text{m}^2$). Não se observou diferenças estatísticas entre os fluorocromos nas diferentes superfícies no grupo OVX (Gráfico 2).

Na correlação entre os grupos controle e OVX, o overlay do grupo controle com superfície HapSr 10% foi significante maior que o grupo OVX de superfície usinada (Tukey test, $p = 0,021$). Já a precipitação do fluorocromo calceína do grupo controle com superfície HapSr 10%, foi significativamente maior que a precipitação de calceína

e de alizarina em todas as superfícies (usinada, Hap, HapSr 10% e HapSr 90%) do grupo OVX (Tukey test, $p < 0,05$) (Gráfico 2).

É importante notar que a superfície usinada, tanto no grupo controle como no OVX, foi a superfície que apresentou menor overlay, além de ser a única superfície que teve menor precipitação do fluorocromo calceína do que da alizarina, o que sugere uma menor formação / mineralização óssea nos estágios iniciais, no caso aos 14 dias, nesta superfície. Em contrapartida, as superfícies tratadas com as hidroxiapatitas apresentaram maior deposição do fluorocromo calceína, o que indica maior atividade de formação óssea periimplantar aos 14 dias, melhorando assim a estabilidade e a osseointegração do parafuso.

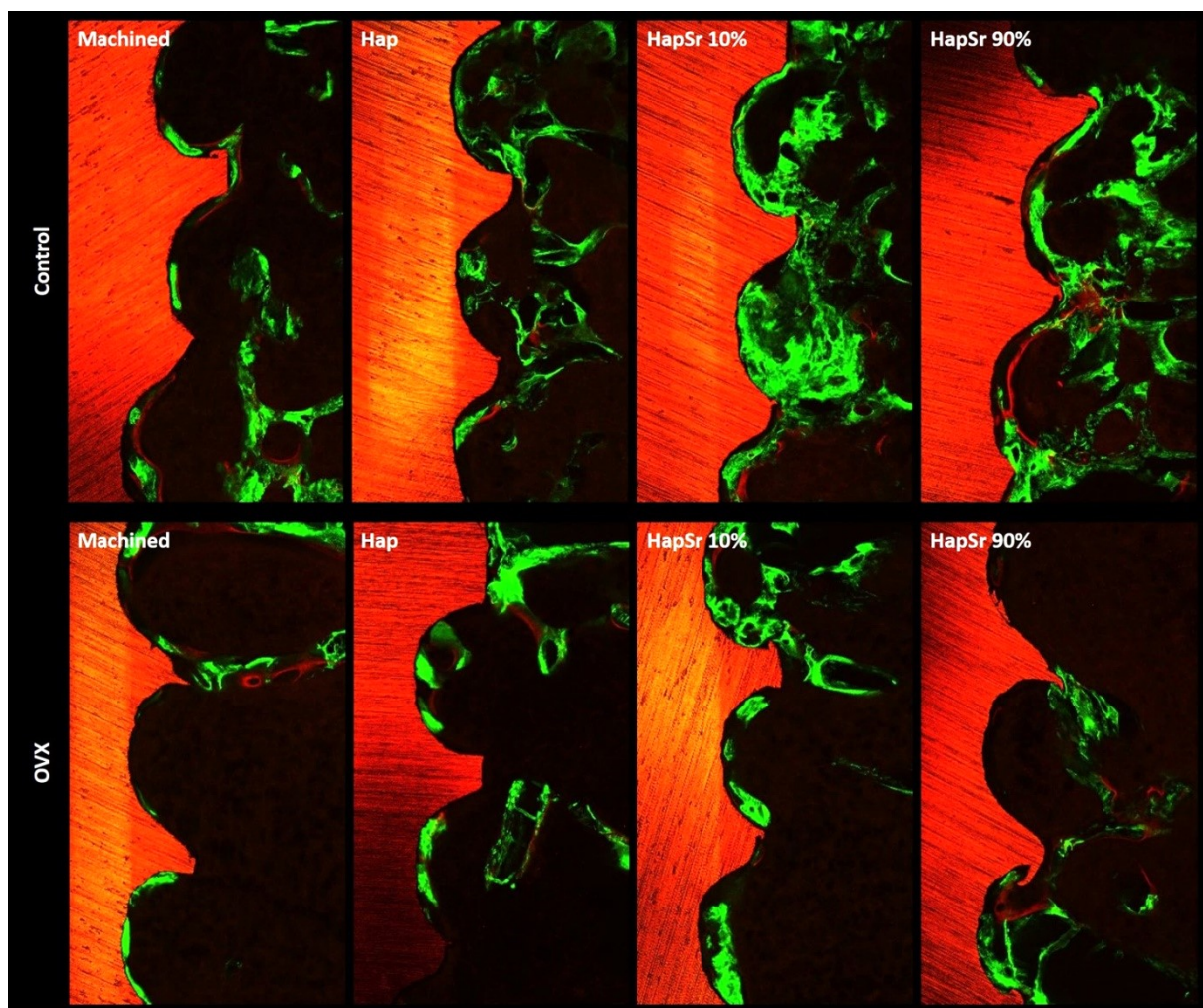


Fig. 9- Imagens do overlay das superfícies usinada, Hap, HapSr 10%, HapSr 90% nos grupos Controle e OVX.

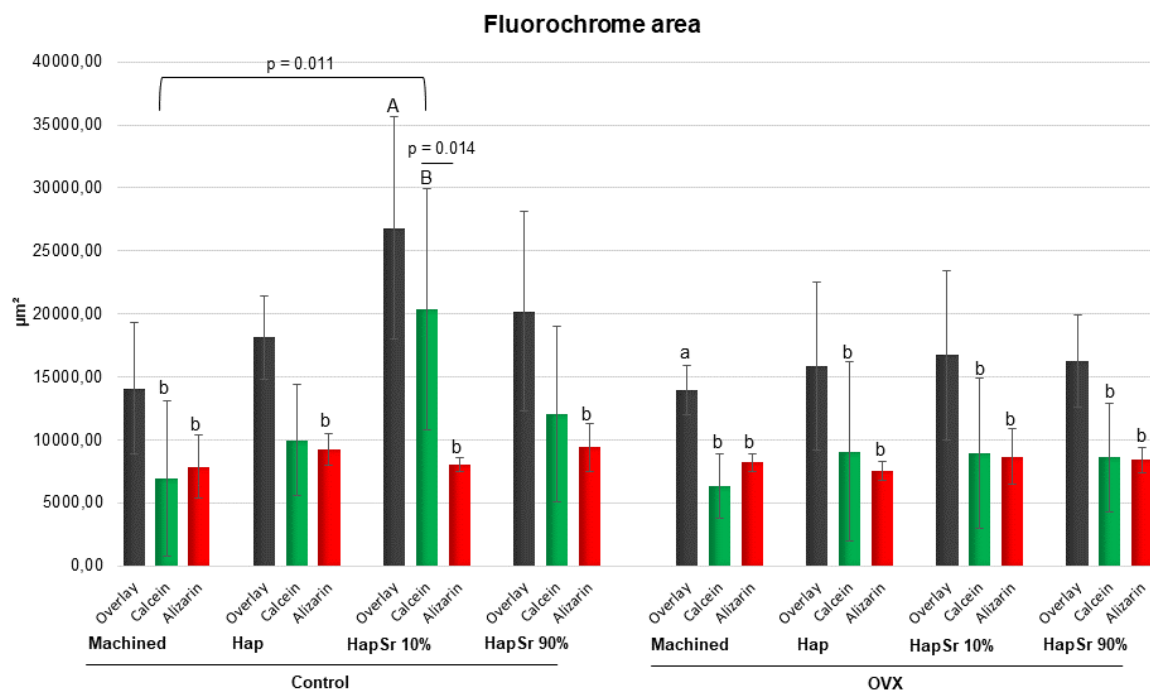


Gráfico 2 – Médias e desvios padrão das áreas dos overlays (sobreposição da calceína e alizarina) e dos fluorocromos calceína (aos 14 dias) e alizarina (aos 42 dias) das diferentes superfícies nos grupos controle e OVX; a; diferença estatística com overlay/ HapSr 10% - grupo controle (Tukey test, $p < 0,05$); b: diferença estatística com calceína/ HapSr 10% - grupo controle (Tukey test, $p < 0,05$).

3.8 Análise da área óssea neoformada

Na análise da área óssea neoformada ao redor dos parafusos na porção medular no grupo controle, observou-se a maior área na superfície de HapSr 10% ($31087,80 \pm 10067,03 \text{ mm}^2$), seguido da superfície de HapSr 90% ($22963,80 \pm 6410,29 \text{ mm}^2$), Hap ($19974,00 \pm 6608,18 \text{ mm}^2$) e a superfície usinada apresentou-se com a menor área óssea formada ($18538,75 \pm 2241,76 \text{ mm}^2$). Houve diferença estatística entre as superfícies HapSr 10% e usinada (Tukey test, $p = 0,042$) (gráfico 3).

No grupo OVX, a superfície com maior área quantificada foi a Hap ($19354 \pm 5067,89 \text{ mm}^2$), acompanhada da superfície de HapSr 10% ($17933,40 \pm 3878,90 \text{ mm}^2$), HapSr 90% ($17704,40 \pm 1542,97 \text{ mm}^2$) e por último a superfície usinada ($13770,00 \pm 3463,48 \text{ mm}^2$), entretanto, não houve diferença para a área óssea neoformada entre as superfícies no grupo OVX (gráfico 3).

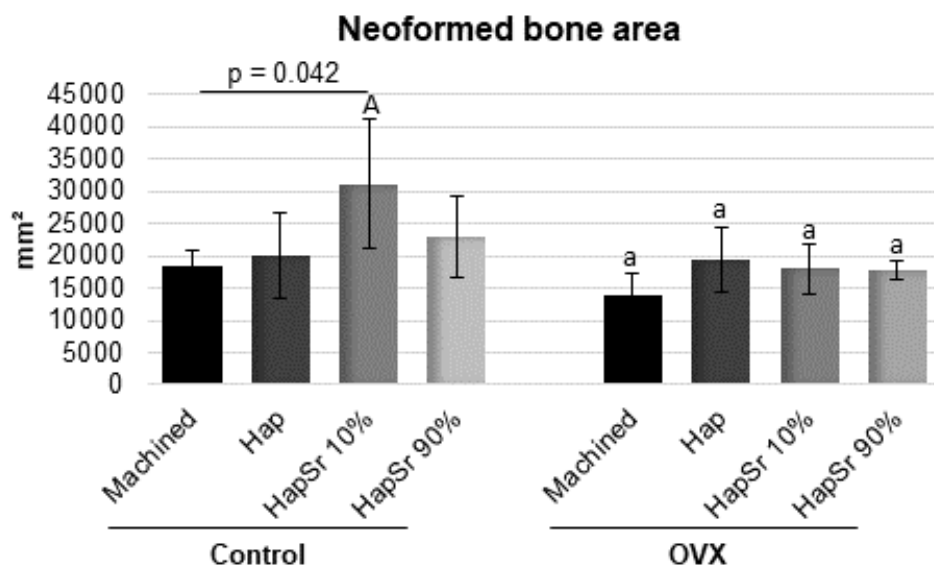


Gráfico 3 – Médias e desvios padrão da área óssea neoformada ao redor dos parafusos com os diferentes tratamentos de superfície nos grupos controle e OVX; a: diferença estatística com HapSr 10% - Controle (Tukey test, $p < 0,05$).

3.9 Análise da extensão de contato entre osso e parafuso

Na análise da extensão de contato entre o parafuso e o tecido ósseo da região medular no grupo controle, os maiores valores de extensão foram nas superfícies HapSr 10% ($1,71 \pm 0,08$ mm), usinada ($1,65 \pm 0,20$ mm), Hap ($1,58 \pm 0,29$ mm) e a menor extensão foi em HapSr 90% ($1,51 \pm 0,24$ mm). Não houve diferença estatística entre as medidas de contato das superfícies no grupo controle (gráfico 4).

No grupo OVX, a maior extensão foi em HapSr 10% ($1,48 \pm 0,32$ mm); seguido da superfície de Hap ($1,45 \pm 0,21$ mm), usinada ($1,23 \pm 0,24$ mm) e a extensão mais reduzida foi na superfície HapSr 90% ($1,20 \pm 0,12$ mm), contudo, não houve diferenças entre as extensões de contato entre o osso e o parafuso no grupo OVX (gráfico 4).

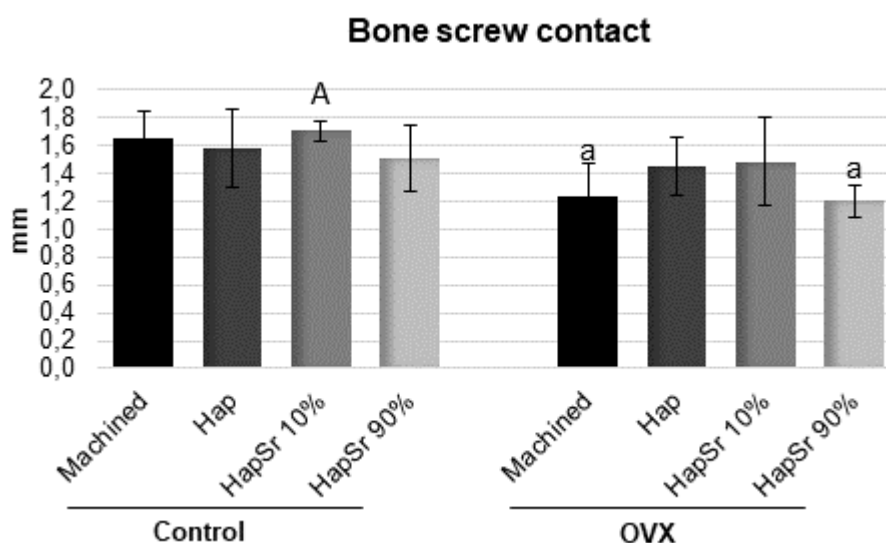


Gráfico 4 – Médias e desvios padrão da extensão linear de contato entre osso e parafuso com as diferentes superfícies nos grupos controle e OVX; a: diferença estatística com HapSr 10% - Controle (Tukey test, $p < 0,05$).

4 Discussão

Com os resultados das análises laboratoriais expostos neste estudo, pode-se afirmar que as superfícies de liga de titânio podem ser tratadas com hidroxiapatita ou com hidroxiapatita modificada por estrôncio, melhorando as propriedades químicas e morfológicas da superfície, aumenta a molhabilidade e energia de superfície, e o tratamento se mantém íntegro mesmo após o trauma de inserção do parafuso no tecido ósseo, desta forma, a hipótese nula foi rejeitada.

Os resultados das análises in vivo, as superfícies tratadas apresentaram de modo geral, maiores valores para torque reverso, maiores áreas de precipitação de fluorocromos e maiores áreas ósseas neoformada do que a superfície usinada, isso ocorreu tanto no grupo controle como no OVX, logo a hipótese nula mais uma vez foi rejeitada.

As principais propriedades das superfícies dos implantes relacionadas à interação entre o implante e os processos celulares do tecido ósseo são a composição química, topografia e molhabilidade. O aumento da rugosidade, leva ao aumento da área de superfície, maiores interações celulares, melhor estabilidade do implante e menor tempo de osseointegração (Coelho et al. 2015). A molhabilidade da superfície confere a habilidade de um fluido se espalhar sobre a superfície, quanto mais hidrofílica a superfície, melhor é o processo de adesão e substituição de proteínas e, desta forma, as células podem aderir a superfície de forma não específica, ou

aderirem se especificamente mediadas por proteínas absorvidas (Olivares-Navarrete et al. 2008; Anselme et al. 2000). Associada com a molhabilidade, outro aspecto importante relacionado à superfície no processo de osseointegração é a carga elétrica, que depende da composição química da superfície do implante, situação inflamatória, pH do meio e outros fatores (Clark et al. 1976). Desta forma, as modificações da topografia de implantes têm como finalidade criar superfícies bioativas que mimetizem a composição e estrutura do tecido, e essa superfície pode ser simulada pela deposição de Hap.

Os tratamentos de superfícies com Hap e HapSr (10 e 90%) modificaram a morfologia da superfície, deixando-a mais rugosa, com topografia em nível nanométrico, e com alta molhabilidade e energia de superfície. Estas propriedades são fundamentais para a superfície de um implante, pois em superfícies rugosas, a presença de poros, picos, ranhuras e outros elementos topográficos na superfície ocorre maior ancoragem de células, maior diferenciação de osteoblastos, bem como intensa adesão de proteínas e síntese de colágeno (Anselme et al. 2000, Jayaraman et al. 2004). Além disso, superfícies de Ti com topografia nanométrica tem uma maior influência na neovascularização, diferenciação de osteoblastos e adesão de proteínas (Khosravi et al. 2018, Khang D et al. 2012), mecanismos que podem levar à osseointegração mais precoce.

As superfícies com nanotopografia aumenta a energia de superfície (Smeets et al. 2016), e como observado neste estudo nas superfícies tratadas, isso ocorreu não apenas pela mudança na rugosidade, mas também por alterações químicas da superfície (filmes finos de Hap), logo houve mudanças nos níveis físico, químico e biológico. Enquanto a microtopografia da superfície do implante atua em nível celular, a nanotopografia influencia nas interações célula-implante e em nível de proteínas, otimizando a formação óssea periimplantar. Liddell et al. (2017) afirma em estudo que as superfícies nano e micro com o passar do tempo ambas a superfícies adquirem o mesmo equilíbrio e platô de osseointegração, entretanto, em implantes com superfície nano a obtenção da homeostasia é mais rápida. Desta forma, as superfícies nano são indicados para instalação de implante imediato após exodontia, protocolos de carregamento precoce e principalmente pacientes com comprometimento ósseo e sistêmico (Smeets et al. 2016, Dohan et al. 2011).

A osteoporose e osteopenia restringem a ancoragem do implante, isso ocorre devido a redução da massa óssea e alterações microestruturais do tecido ósseo nestes pacientes (Marco et al. 2005). Em estudo (Herrmann et al. 2005) mostrou que a falha do implante em pacientes com osteoporose está associada a espessura do osso cortical, pois o osso esponjoso é mais reduzido, assim, a osteoporose afeta a cicatrização óssea ao redor do implante, e esses pacientes requerem monitoramento mais frequente da estabilidade do implante, bem como implantes com boas propriedades de superfície.

Em estudos (Marie PJ, 2003, Hurtel-Lemaire et al. 2009) com ranelato de estrôncio, um fármaco desenvolvido para o tratamento da osteoporose, observou-se que o estrôncio (Sr), administrado sistemicamente, ativa os receptores sensitivos de cálcio do tecido ósseo, ocasionando aumento da OPG (osteoprotegerina) e diminuição da RANKL (ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B). Em ratas ovariectomizadas, o estrôncio preveniu perda óssea, aumentou a massa óssea em animais osteopênicos e a resistência óssea em animais normais (Grynpas and Marie, 1990; Marie PJ, 2005). Em estudos em humanos, o tratamento com ranelato de estrôncio aumentou a densidade óssea mineral (Meunier et al. 2002) e diminuiu o risco de fratura vertebral (Meunier et al. 2004). A curto prazo o estrôncio se deposita sobre cristais de hidroxiapatita e a longo prazo permuta com o cálcio, mantendo se ligados com o tecido ósseo (Meunier et al. 2004).

Muitos estudos relatam o efeito positivo do Sr tanto em *in vitro* (Cruz et al. 2019; Bonnelye et al. 2008) como *in vivo* (Liu F et al. 2019; Li Y et al. 2010). O Sr reduz a reabsorção óssea, inibindo a proliferação de osteoclastos e melhorando a formação óssea, estimulando a proliferação de osteoblastos (Bonnelye et al. 2008). Também foi demonstrado que o Sr melhora a replicação celular osteogênica e a atividade dos osteoblastos, incluindo a síntese da matriz óssea e a atividade da fosfatase alcalina, além de reduzir os marcadores osteoclásticos gerados na diferenciação das células da medula óssea, inibindo a diferenciação dos osteoclastos e reduzindo a atividade dos osteoclastos (Cruz et al. 2019, Ni et al. 2011). Além disso, Sr estimula a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e de outras células progenitoras (Cruz et al. 2019, Capuccini C et al. 2008). No presente estudo, as superfícies de HapSr 10 e 90% tiveram os maiores torques reverso para remoção do parafuso em ratas ovariectomizados e a superfície de HapSr 10%

apresentou maior precipitação de fluorocromos e área óssea neoformada no grupo controle. Isso implica que implantes dentários revestidos com HapSr podem ser úteis não só em pacientes osteoporóticos, como também otimizar a osseointegração em pacientes saudáveis.

No trabalho de Li Y et al. 2010, que comparou superfícies tratadas com Hap e Hap modificada por Sr a 10% em bastões de Ti pela técnica sol-gel e instalados em tíbias de ratas OVX, a superfície tratada com hidroxiapatita modificada por Sr mostrou-se superior a superfície de hidroxiapatita em relação a osseointegração, com maior proporção de área óssea, contato entre osso e implante, volume ósseo e resistência ao cisalhamento. Entretanto, no presente estudo, houve a comparação entre 4 superfícies, os tratamentos de superfícies com Hap e Hap modificada por Sr com foram feitas pela técnica biomimética e os implantes foram parafusos de fixação instalados nas tíbias de ratas saudáveis e OVX, e os resultados foram mais favoráveis para as superfícies tratadas independente da condição sistêmica. O método biomimético para deposição de Hap sobre superfícies é uma técnica relativamente barata e muito eficiente, que permite a formação de Hap semelhante ao processo *in vivo* (Cruz et al. 2019, de Souza et al. 2014, de Faria et al. 2018), diferentemente da técnica sol-gel, que necessita de equipamentos caros e de elevadas temperaturas, o que pode encarecer o produto final, se comercializado.

Em conclusão, as superfícies tratadas com hidroxiapatita e hidroxiapatita modificada por estrôncio confeccionadas pelo método biomimético confere a formação de filmes finos sobre as superfícies, com alterações estruturais e de composição química com formação de Hap semelhante a Hap do tecido ósseo, além de aumentar a molhabilidade e a energia livre da superfície. Além disso, estas superfícies têm um efeito promotor na osseointegração de parafusos em tíbias de animais saudáveis e osteoporóticos.

Referências

- Albrektsson, T. & U. Lekholm (1989) Osseointegration: current state of the art. *Dent Clin North Am*, 33, 537-54.
- Anselme, K., P. Linez, M. Bigerelle, D. Le Maguer, A. Le Maguer, P. Hardouin, H. F. Hildebrand, A. Iost & J. M. Leroy (2000a) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials*, 21, 1567-77.
- Blake, G. M. & I. Fogelman (2006) Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis: a review of safety and efficacy. *Clin Interv Aging*, 1, 367-75.
- Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008;42(1):129-138. doi:10.1016/j.bone.2007.08.043
- Bortagaray, M. A., C. A. Ibanez, M. C. Ibanez & J. C. Ibanez (2016) Corrosion Analysis of an Experimental Noble Alloy on Commercially Pure Titanium Dental Implants. *Open Dent J*, 10, 486-496.
- Branemark, P. I., R. Adell, T. Albrektsson, U. Lekholm, J. Lindstrom & B. Rockler (1984) An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *J Oral Maxillofac Surg*, 42, 497-505.
- Capuccini, C., P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I. N. Mihailescu & A. Bigi (2008) Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater*, 4, 1885-93.
- Clark, A. E., L. L. Hench & H. A. Paschall (1976) The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection. *J Biomed Mater Res*, 10, 161-74.
- Coelho, P. G., M. Suzuki, C. Marin, R. Granato, L. F. Gil, N. Tovar, R. Jimbo, R. Neiva & E. A. Bonfante (2015) Osseointegration of Plateau Root Form Implants: Unique Healing Pathway Leading to Haversian-Like Long-Term Morphology. *Adv Exp Med Biol*, 881, 111-28.
- Cruz, M. A. E., M. B. T. Zanatta, M. da Veiga, P. Ciancaglini & A. P. Ramos (2019) Lipid-mediated growth of SrCO₃/CaCO₃ hybrid films as bioactive coatings for Ti surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 99, 762-769.
- Davies JE, Ajami E, Moineddin R, Mendes VC. The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant

- interface. *Biomaterials*. 2013;34(14):3535-3546.
doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.024
- Davies JE, Mendes VC, Ko JC, Ajami E. Topographic scale-range synergy at the functional bone/implant interface. *Biomaterials*. 2014;35(1):25-35.
doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.072
- de Faria, A. N., M. A. E. Cruz, G. C. M. Ruiz, D. C. Zancanela, P. Ciancaglini & A. P. Ramos (2018) Different compact hybrid Langmuir-Blodgett-film coatings modify biomineralization and the ability of osteoblasts to grow. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106, 2524-2534.
- de Souza, I. D., M. A. Cruz, A. N. de Faria, D. C. Zancanela, A. M. Simao, P. Ciancaglini & A. P. Ramos (2014a) Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate-LB film as template. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 118, 31-40.
- Dohan Ehrenfest, D. M., L. Vazquez, Y. J. Park, G. Sammartino & J. P. Bernard (2011) Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 14 dental implant surfaces. *J Oral Implantol*, 37, 525-42.
- Grynpas, M. D. & P. J. Marie (1990) Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. *Bone*, 11, 313-9.
- Hatamleh, M. M., X. Wu, A. Alnazzawi, J. Watson & D. Watts (2018) Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dent Mater*, 34, 676-683.
- Herrmann, I., U. Lekholm, S. Holm & C. Kultje (2005) Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20, 220-30.
- Hurtel-Lemaire, A. S., R. Mentaverri, A. Caudrillier, F. Cournarie, A. Wattel, S. Kamel, E. F. Terwilliger, E. M. Brown & M. Brazier (2009) The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem*, 284, 575-84.
- Jayaraman, M., U. Meyer, M. Buhner, U. Joos & H. P. Wiesmann (2004) Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*, 25, 625-31.
- Khang, D., J. Choi, Y. M. Im, Y. J. Kim, J. H. Jang, S. S. Kang, T. H. Nam, J. Song & J. W. Park (2012) Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 33, 5997-6007.

Khosravi, N., A. Maeda, R. S. DaCosta & J. E. Davies (2018) Nanosurfaces modulate the mechanism of peri-implant endosseous healing by regulating neovascular morphogenesis. *Commun Biol*, 1, 018-0074.

Kokubo, T. (1991) Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, 12, 155-63.

Kokubo, T., S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi & T. Yamamuro (1990) Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*, 24, 331-43.

Kokubo, T. & H. Takadama (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27, 2907-15.

Li, Y., Q. Li, S. Zhu, E. Luo, J. Li, G. Feng, Y. Liao & J. Hu (2010a) The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials*, 31, 9006-14.

Liddell, R., E. Ajami & J. E. Davies (2017) Tau (tau): A New Parameter to Assess the Osseointegration Potential of an Implant Surface. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 32, 102-112.

Liu, F., Y. Li, J. Liang, W. Sui, A. Bellare & L. Kong (2019) Effects of micro/nano strontium-loaded surface implants on osseointegration in ovariectomized sheep. *Clin Implant Dent Relat Res*, 21, 377-385.

Marco, F., F. Milena, G. Gianluca & O. Vittoria (2005) Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*, 36, 630-44.

Marie, P. J. (2003) Optimizing bone metabolism in osteoporosis: insight into the pharmacologic profile of strontium ranelate. *Osteoporos Int*, 14, 002-1344.

Marie, P. J., P. Ammann, G. Boivin & C. Rey (2001a) Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*, 69, 121-9.

Meunier, P. J., C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J. E. Badurski, T. D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E. M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H. K. Genant & J. Y. Reginster (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 350, 459-68.

Meunier, P. J., D. O. Slosman, P. D. Delmas, J. L. Sebert, M. L. Brandi, C. Albanese, R. Lorenc, S. Pors-Nielsen, M. C. De Vernejoul, A. Roces & J. Y. Reginster (2002) Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2060-6.

Ni, G. X., Z. P. Yao, G. T. Huang, W. G. Liu & W. W. Lu (2011) The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 961-7.

Olivares-Navarrete, R., P. Raz, G. Zhao, J. Chen, M. Wieland, D. L. Cochran, R. A. Chaudhri, A. Ornoy, B. D. Boyan & Z. Schwartz (2008) Integrin $\alpha 2 \beta 1$ plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15767-72.

Owens, D. K. & Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1741–1747 (1969).

Qiu, K., X. J. Zhao, C. X. Wan, C. S. Zhao & Y. W. Chen (2006) Effect of strontium ions on the growth of ROS17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. *Biomaterials*, 27, 1277-86.

Ramalho-Ferreira, G., L. P. Faverani, G. A. Grossi-Oliveira, T. Okamoto & R. Okamoto (2015) Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt*, 20, 038003.

Ratnayake, J. T. B., M. Mucalo & G. J. Dias (2017) Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 1285-1299.

Smeets, R., B. Stadlinger, F. Schwarz, B. Beck-Broichsitter, O. Jung, C. Precht, F. Kloss, A. Grobe, M. Heiland & T. Ebker (2016) Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *Biomed Res Int*, 6285620, 11.

Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J*. 2020;19:89-107. Published 2020 Jan 10. doi:10.17179/excli2019-1990

Anexos

1. Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da osseointegração da incorporação de hidroxiapatita modificada por estrôncio em superfícies de implantes em osso saudável e osteoporótico"**, Processo FOA nº 00384-2018, sob responsabilidade de Fellippo Ramos Verri apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Maio de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2020.

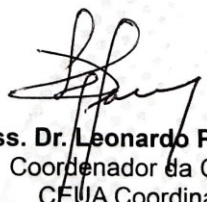
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect on osseointegration of incorporation of strontium modified hydroxyapatite on surfaces of implants in healthy and osteoporotic bone"**, Protocol FOA nº 00384-2018, under the supervision of Fellippo Ramos Verri presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

2. Normas da Revista Journal of Biomedical Materials Research Part A

Aims and Scope

The *Journal of Biomedical Materials Research Part A* is an international, interdisciplinary, English-language publication of original contributions concerning studies of the preparation, performance, and evaluation of biomaterials; the chemical, physical, toxicological, and mechanical behavior of materials in physiological environments; and the response of blood and tissues to biomaterials. The Journal publishes peer-reviewed articles on all relevant biomaterial topics including the science and technology of alloys, polymers, ceramics, and reprocessed animal and human tissues in surgery, dentistry, artificial organs, and other medical devices. The Journal also publishes articles in interdisciplinary areas such as tissue engineering and controlled release technology where biomaterials play a significant role in the performance of the medical device.

The *Journal of Biomedical Materials Research* is the official journal of the Society for Biomaterials (USA), the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials.

Articles are welcomed from all scientists. Membership in the Society for Biomaterials is not a prerequisite for submission.

Online Submission and Peer Review

Journal of Biomedical Materials Research Part A is pleased to offer web-based submission and peer review.

To submit your manuscript online please:

Log on to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a>. If you have not already done so, create an account for yourself in the system by clicking on the "Create an Account" button. To monitor the progress of your manuscript throughout the review process, just login periodically and check your Author Center.

Please be sure to study the Instructions and Forms given at the site carefully, and then let the system guide you through the submission process. Online help is available to you at all times during the process. You are also able to exit/re-enter at any stage before finally "submitting" your work. All submissions are kept strictly confidential. If you have any questions, do not hesitate to contact us at jbmra@wiley.com.

To ensure the most rapid review process for submitted manuscripts, it is a requirement for authors to suggest at least 4 possible reviewers for their paper with complete contact information, including name, affiliation, and email address. Please note that it is a requirement to include the affiliated institution of each preferred reviewer. We also require that you list the reviewer's institutional email address, instead of their personal

account. Your submission will be unsubmitted to address these issues if they are not listed correctly.

Authors in Japan please note: [Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Copyright/Licensing and Permissions:

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:
CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen: If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):
Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA
To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA
To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-->

[License.html](#).

It is the author's responsibility to obtain written permission to reproduce material that has appeared in another publication.

Use of Animals: When animals are used in the research reported, the authors must state: "NIH guidelines (or for non-U.S. residents similar national regulations) for the care and use of laboratory animals (NIH Publication #85-23 Rev. 1985) have been observed." In studies involving human subjects, the authors must include; "all subjects enrolled in this research have responded to an Informed Consent which has been approved by my Institutional Committee on Human Research and that this protocol has been found acceptable by them." The dates of approval by the Committee and the ethical guidelines followed should be made a part of the Methods section.

Conflict of Interest. JBMR has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. They must select one of the following applicable statements as indicated by superscript following the title of their manuscripts.

1. The author, or one or more of the authors, has received or will receive remuneration or other prerequisites for personal or professional use from a commercial or industrial agent in direct or indirect relationship to their authorship.
2. The benefits accruing to the author or authors from a commercial or industrial party will be applied to a research fund, nonprofit institution or other organization with which the author(s) are associated.
3. No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the author(s).
4. The author(s) choose not to respond to any of the above listed statements.

Publication Ethics: The *Journal of Biomedical Materials Research Part A* is a member of the Committee on Publication Ethics and subscribes to its recommendations (Committee on Publication Ethics [COPE]: guidelines on good publication practice, www.publicationethics.org). The policy of Wiley and of JBMR Part A on the major ethical principles of academic publishing are described in our Best Practice Guidelines on Publication Ethics: <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html> (Graf C, Wager E, Bowman A, et al., Int J Clin Pract 2007; 61 [suppl 152]: 126). The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds. All authors are responsible for adhering to guidelines on good publication practice.

Instructions for Manuscript Preparation

Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files

should be formatted as .doc or .rtf files. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as LaTeX. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists.

Original Articles should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Title Page: The name(s) and affiliation of the author(s) should appear only on a separate title page. Please do not mark any other parts of the manuscript with name(s) and affiliation(s) of author(s). Use only a short title on the following pages of the manuscript. Author(s) name(s) should not be used. The paper should be subdivided into the expected classical sections and, if necessary, subsections. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Abstract: A short synopsis (200 words or less) is required for all papers. This synopsis should be carefully prepared, for it is the source of most abstracts. The synopsis should be a summary of the entire paper, not the conclusions alone, and should precede the main body of the paper.

Keywords: The author is requested to supply, below the synopsis, a list of five keywords or phrases that most clearly typify the outstanding points made in the manuscript.

References:

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. Sample references follow:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.
2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.
3. Gilmore ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss; 1998. p 75-90. Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Symbols and Equations: Authors are cautioned to type, wherever possible, all mathematical and chemical symbols, equations, and formulas and to identify in the margin all Greek or unusual symbols the first time they are used (e.g., k , K , α , x , y). Underline all vector quantities with a wavy line. Use fractional exponents to avoid root signs. When mentioning a material, chemical reagent, instrument or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is required, list it as a footnote.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool).

Illustrations: When preparing digital art, please consider:
Resolution: The minimum requirements for resolution are:
1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.
300 DPI/PPI for picture-only photographs
600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Author Alterations or Revisions. It is absolutely necessary to limit alterations to factual and typographical errors. Authors will be charged for revisions, and publication of their work will be delayed. In order to expedite the publication and online posting of articles in Wiley Online Library, JBMR sends page proofs in pdf format via e-mail to the corresponding author's e-mail address. Please follow the instructions in the e-mail; contact names and numbers are given for questions, problems, or if an author wishes to receive a paper proof.

Article Promotion Support

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries,

and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see the [Wiley Author Services page](#).