



(21) BR 102021019548-7 A2

(22) Data do Depósito: 29/09/2021

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

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

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

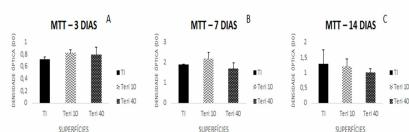
(51) Int. Cl.: A61L 27/06; A61L 27/34.

(52) CPC: A61L 27/06; A61L 27/34.

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

(72) Inventor(es): ROBERTA OKAMOTO; PAULO NORONHA LISBOA FILHO; LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS; ANA CLÁUDIA ERVOLINO DA SILVA; IGOR LEBEDENCO KITAGAWA; PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA.

(57) Resumo: FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM ANABÓLICO ÓSSEO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS. O presente pedido de patente de invenção consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes osseointegráveis), utilizando uma molécula bioativa que promove respostas favoráveis ao processo de reparo periimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na teriparatida, fármaco utilizado sistemicamente como anabólico ósseo e que é um análogo do paratormônio. Sabe-se que o paratormônio se liga a receptores presentes em osteoblastos, células diretamente responsáveis pelo processo de formação óssea. O processo de funcionalização da superfície dos implantes é realizado a partir da técnica de layer by layer, onde a partir da interposição de camadas com diferentes cargas elétricas, cria-se um substrato para que a molécula funcionalizadora (no caso, o anabólico ósseo) esteja localizada externamente à superfície do implante. A ideia implícita nesta tecnologia consiste na ação da teriparatida junto a receptores dos osteoblastos, ativando vias de sinalização que estimulam o processo de formação óssea, contribuindo com a aceleração do reparo periimplantar e melhora da qualidade do tecido ósseo que atuará como leito receptor para (...).



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

INTRODUÇÃO

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

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado na confecção de implantes osseointegráveis com a superfície ativada por anabólicos ósseos.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] Estudos propõem a utilização do fármaco sistemicamente, em função do seu efeito anabólico sobre o tecido ósseo. Há estudos em que este fármaco foi administrado sistemicamente, concomitante à instalação de implantes com ácido zoledrônico adsorvido à superfície. Osteoporos. Int. (2013): 24: 1063-1071).

[004] Recentemente, o grupo de pesquisa responsável por este pedido desenvolveu estudos que avaliaram este anabólico ósseo sistemicamente e foram observados resultados favoráveis quanto ao reparo ósseo, seja em sítios pós exodônticos (*Clin Oral Investigations* (2019), May; 23 (5): 2313-2322; *Arch Oral Biol* (2019) Jun; 102:147-154) ou periimplantares (Osteoporos. Int. (2020) Sep; 31 (9): 1807-1815. Em função do excelente desempenho deste anabólico administrado sistemicamente e a partir dos seus efeitos locais sobre osteoblastos, células que produzem osso no sítio reparacional (foco desta proposta), considera-se que esta proposta será bastante promissora para a área da implantodontia.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

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

[006] A atual proposta é inovadora, uma vez que busca incorporar o anabólico ósseo à superfície do implante, melhorando as propriedades deste dispositivo que é instalado no tecido ósseo. O objetivo é acelerar as respostas celulares de forma que o processo de osseointegração seja alcançado mais rapidamente sem prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

[007] A intenção é de que esta tecnologia, uma vez que tenha a comprovação da sua segurança e eficácia, seja disponibilizada para que os implantes com esta superfície anabólica sejam comercializados e disponibilizados para a população. O intuito é favorecer e acelerar o processo de osseointegração, melhorando quantidade e qualidade do tecido ósseo, principalmente frente a condições fisiológicas que podem ser encontradas na população: condições sistêmicas alteradas, senescência são importantes exemplos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[008] O presente pedido de patente de invenção tem por objetivo funcionalizar a superfície dos implantes com um medicamento anabólico ósseo, através da técnica de *layer by layer*. A técnica "*Layer-by-Layer*" (LBL) consiste na adsorção de polieletrólitos ou nanopartículas em um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície).

[009] A carga do material a ser adsorvido deve ser contrária à do substrato, para que ocorra adsorção por atração eletrostática. Ao adsorver à superfície do substrato, parte da carga do material adsorvido não é compensada, invertendo a carga resultante da superfície e permitindo a adsorção de outro material de carga distinta ao anterior. Cada nova adsorção implica no crescimento de uma camada no material adsorvido, sendo regido pelas ligações iônicas, podendo haver significativa contribuição de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, dentre outras. [010] Para o desenvolvimento do dispositivo aqui descrito, para fins de utilização como implante odontológico, foram utilizados o dióxido de titânio (TiO_2), o poli (4-estireno sulfonato de sódio) - PSS e a teriparatida. O TiO_2 foi obtido através de uma rota sol-gel e dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico (HCl), pH 2,5. Nesse pH, o TiO_2 possui carga positiva.

[011] O PSS foi dissolvido também em solução aquosa de HCl, pH 2,5, possuindo carga negativa em sua cadeia. Um filme de LBL de PSS e TiO_2 foi crescido na superfície do implante dando origem a um dispositivo de ancoragem para a teriparatida. Esta apresenta afinidade com nanopartículas negativas, possuindo possivelmente sítios positivos em sua estrutura.

[012] Foram testadas 2 concentrações da teriparatida: 10ng e 40 ng. Preliminarmente, esta técnica de LBL foi utilizada para incorporar a teriparatida nas duas concentrações mencionadas aos discos de titânio, a fim de realizar os estudos em culturas de células mesenquimais, obtidas do fêmures de ratos.

[013] Os testes em culturas de células foram realizados com o objetivo de caracterizar o metabolismo celular em contato com as duas concentrações de teriparatida junto à superfície dos discos de titânio e quantificar os nódulos de mineralização que as células mesenquimais podem produzir, a partir do contato com as superfícies dos implantes funcionalizados ou não, em contato com as duas concentrações de teriparatida incorporadas aos discos de titânio.

[014] A partir da avaliação conjunta dos 2 testes mencionados, foi selecionada a concentração de 10ng para que os estudos *in vivo* fossem realizados. Assim, a partir da técnica de LBL, já descrita, utilizando-se a teriparatida na concentração de 10ng, foram preparados os implantes utilizados nos estudos *in vivo*. Implantes com a medida de 1,4mm de diâmetro por 2,7 mm de comprimento foram utilizados. Parte destes implantes foram mantidos com a superfície convencional, vinda de fábrica, e a outra metade foi funcionalizada com teriparatida na concentração selecionada pelos experimentos de cultura de células.

[015] Para o desenvolvimento destes estudos, ratas foram selecionadas a partir da normalidade do seu ciclo estral e foram submetidas à cirurgia de exodontia de 1º Molar Superior, seguida da instalação imediata dos implantes em questão, sempre 1 implante por animal, seja convencional ou funcionalizado, totalizando um n de 12 animais. Passados 28 dias, o teste de torque de remoção foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência oferecida pelo tecido ósseo à remoção do implante através de torquímetro

digital. Os resultados obtidos mostraram que maiores valores de torque foram observados durante a remoção dos implantes funcionalizados com teriparatida em comparação aos valores obtidos durante a remoção dos implantes convencionais, sendo esta diferença estatisticamente significativa (teste t não pareado, $p < 0,05$).

[016] A figura 1 apresenta os resultados obtidos pelo ensaio MTT após 3 (figura 1A), 7 (figura 1B) e 14 dias (figura 1C) de incubação, em que foi avaliado o metabolismo de células mesenquimais em contato com os discos de titânio que possuíam superfície convencional funcionalizadas com teriparatida 10ng ou funcionalizadas com teriparatida 40 ng. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies ao longo dos períodos avaliados ($p > 0,05$).

[017] A figura 2 apresenta o gráfico com os valores obtidos a partir da quantificação da formação de nódulos de mineralização após 14 dias de contato entre as células mesenquimais e as diferentes superfícies avaliadas: titânio convencional (Ti), funcionalização com teriparatida a 10ng (10 ng) e funcionalização com teriparatida a 40 ng (Teri 40). Houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies Ti e Teri 10 ($p < 0,05$).

[018] Avaliando o conjunto de resultados, considera-se que a concentração de 10ng permitiu que fossem obtidos resultados favoráveis quanto ao metabolismo celular e à formação de nódulos de mineralização, por esse motivo por esse motivo, a mesma concentração foi selecionada para os experimentos *in vivo*.

[019] A figura 3 apresenta os valores médios obtidos pelo torque de remoção após 28 dias da instalação imediata de implantes com superfície convencional (Ti) ou funcionalizada com teriparatida 10 ng (Teri 10) em ratas ciclando normalmente e em condições homeostáticas. Neste gráfico do experimento *in vivo* observa-se um aumento significativo dos valores de torque de remoção dos implantes funcionalizados com teriparatida 10 ng em comparação com os implantes de superfície convencional.

[020] A melhora do processo de osseointegração, inclusive considerando-se a possibilidade de aceleração desta resposta em função do estímulo anabólico ósseo.

[021] O diferencial da tecnologia proposta é a possibilidade de se desenvolver superfícies de implantes mais específicas para o tipo de leito receptor dos pacientes.

Um planejamento individualizado das cirurgias de instalação de implantes será de grande valia para que se possa obter respostas mais favoráveis quanto a osseointegração, otimizando o período entre cirurgia de instalação de implantes e procedimentos reabilitadores.

[022] Uma possível desvantagem seria o preço do fármaco a ser utilizado para a funcionalização da superfície dos implantes. A teriparatida (Forteo, Lilly) é uma medicação cara, porém eficiente quanto ao estímulo para o anabolismo do tecido ósseo. Já se mostrou bastante eficaz quando administrada sistemicamente para a melhora no processo de formação óssea. No entanto, seu uso é indicado durante 24 meses no máximo e este é um dos motivos que nos motivou a tentar utilizá-lo de forma local sobre o tecido ósseo. A resposta anabólica que esta substância promove considerado o seu efeito sobre receptores de osteoblastos no sítio reparacional precisa ser melhor aproveitada e este é o intuito desta proposta. Por fim, é um fármaco de custo elevado, no entanto, consideramos que este aspecto é compensado pelo seu efeito bastante favorável sobre o anabolismo ósseo.

[023] A atual proposta é inovadora, pois busca incorporar o anabólico ósseo à superfície do implante, melhorando as propriedades deste dispositivo que é instalado no tecido ósseo. A ideia é acelerar as respostas celulares de forma que o processo de osseointegração seja alcançado mais rapidamente sem prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

[024] Neste momento realizou-se a avaliação do torque de remoção que consiste na avaliação funcional do tecido ósseo periimplantar frente a utilização da superfície anabólica aqui proposta. Os resultados mostram que há um aumento significativo na força aplicada para se remover este implante anabólico, em comparação às superfícies convencionais. Mais estudos estão em desenvolvimento, com testes histológicos, testes imunoistoquímicos (caracterizando as proteínas do tecido ósseo presentes na região periimplantar), testes de histometria dinâmica e teste de microtomografia computadorizada. Estes testes que serão executados na sequência serão importantes para melhor caracterizar o tecido ósseo perimplantar, no entanto, consideramos que o teste biomecânico (torque de remoção) é de grande valia para mostrar a funcionalidade

do tecido ósseo periimplantar e consiste num dado de extrema importância para avaliar a resposta de osseointegração.

[025] Atualmente o mercado tem-se voltado para a utilização de superfícies biologicamente ativadas como a superfície acqua da neodent e a superfície SLActive da Plenum. No entanto, considera-se que o diferencial da nossa superfície consiste na incorporação de uma molécula que atua ativando as respostas celulares no sítio reparacional. Esta ativação celular será de grande valia para garantir a melhora no processo de reparo ósseo periimplantar.

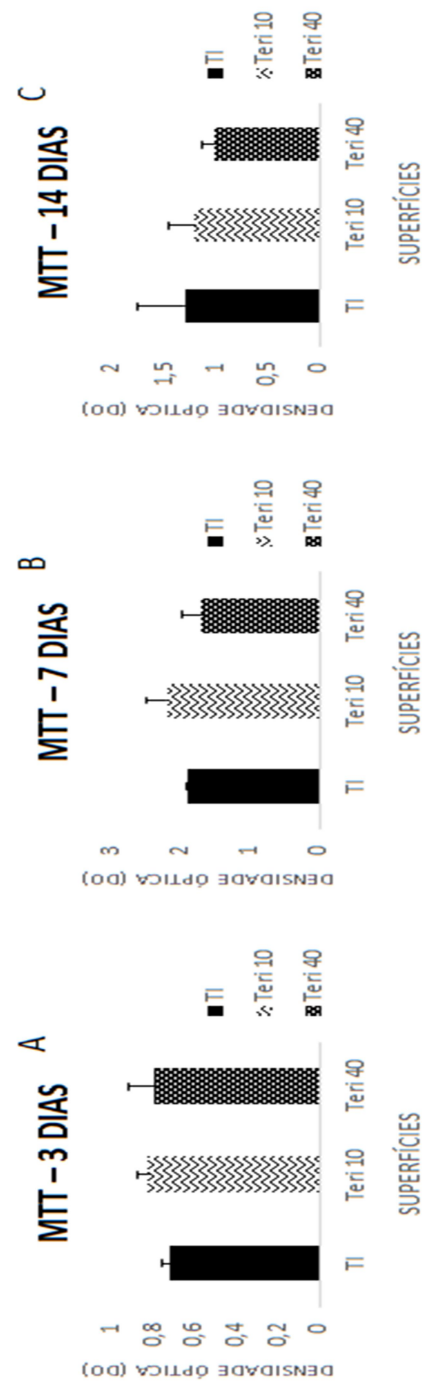
[026] A realização desta tecnologia, melhorando a bioatividade da superfície do implante, é importante para que procedimentos reabilitadores na cavidade oral, como a instalação de implantes osseointegráveis, seja acessível a maior parte dos pacientes. Muitos destes apresentam algum tipo de contra-indicação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

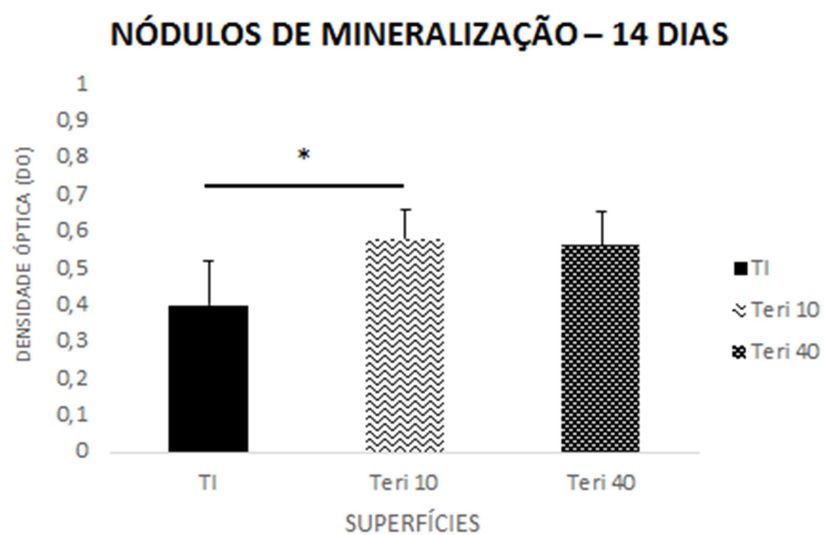
REIVINDICAÇÕES

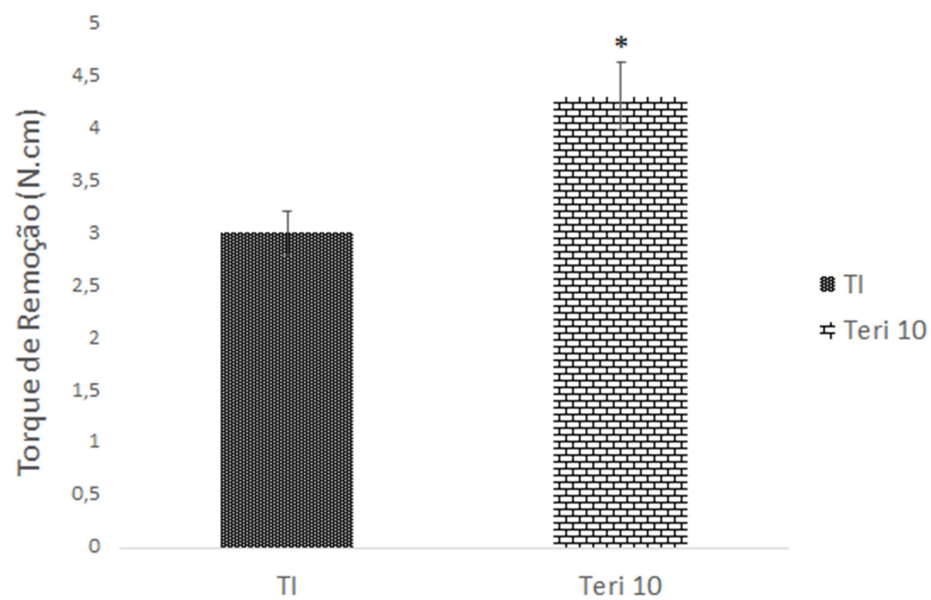
1. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM ANABÓLICO ÓSSEO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *LAYER BY LAYER* COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS, a dita funcionalização da superfície dos implantes com um medicamento anabólico ósseo, **caracterizada por** ser realizada através da técnica de *layer by layer* e consistir na adsorção de polieletrólitos ou nanopartículas em um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície); em que a carga do material a ser adsorvido deve ser contrária à do substrato, para que ocorra adsorção por atração eletrostática; em que ao adsorver à superfície do substrato, parte da carga do material adsorvido não é compensada, invertendo a carga resultante da superfície e permitindo a adsorção de outro material de carga distinta ao anterior; em que cada nova adsorção implica no crescimento de uma camada no material adsorvido, sendo regido pelas ligações iônicas, podendo haver significativa contribuição de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, dentre outras; em que para o desenvolvimento do dispositivo aqui descrito, para fins de utilização como implante odontológico, foram utilizados o dióxido de titânio (TiO_2), o poli (4-estireno sulfonato de sódio) - PSS e a teriparatida; em que o TiO_2 foi obtido através de uma rota sol-gel e dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico (HCl), pH 2,5; em que nesse pH, o TiO_2 possui carga positiva; em que o PSS foi dissolvido também em solução aquosa de HCl, pH 2,5, possuindo carga negativa em sua cadeia; em que um filme de LBL de PSS e TiO_2 foi crescido na superfície do implante dando origem a um dispositivo de ancoragem para a teriparatida; em que a superfície apresenta afinidade com nanopartículas negativas, possuindo possivelmente sítios positivos em sua estrutura; em que foram testadas 2 concentrações da teriparatida: 10ng e 40 ng e preliminarmente, esta técnica de LBL foi utilizada para incorporar a teriparatida nas duas concentrações mencionadas aos discos de titânio, a fim de realizar os estudos em culturas de células mesenquimais, obtidas do fêmures de ratos; em que a partir da avaliação conjunta dos 2 testes mencionados, foi selecionada a concentração de 10ng para que os estudos in vivo fossem realizados e assim, a partir da técnica de LBL,

utilizou-se a teriparatida na concentração de 10ng para funcionalizar os implantes utilizados em estudos *in vivo*; em que os implantes com a medida de 1,4mm de diâmetro por 2,7 mm de comprimento foram utilizados parte destes implantes foram mantidos com a superfície convencional, vinda de fábrica, e a outra metade foi funcionalizada com teriparatida na concentração selecionada pelos experimentos de cultura de células.

2. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM ANABÓLICO ÓSSEO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIIMPLANTAR EM RATAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** desenvolvimento destes estudos em ratas que foram selecionadas a partir da normalidade do seu ciclo estral e foram submetidas à cirurgia de exodontia de 1º. Molar Superior, seguida da instalação imediata dos implantes em questão, sempre 1 implante por animal, seja convencional ou funcionalizado, totalizando um n de 12 animais; em que, passados 28 dias, o teste de torque de remoção foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência oferecida pelo tecido ósseo à remoção do implante através de torquímetro digital.



**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

RESUMO

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

O presente pedido de patente de invenção consiste em funcionalizar a superfície de dispositivos utilizados para procedimentos reabilitadores em odontologia (implantes osseointegráveis), utilizando uma molécula bioativa que promove respostas favoráveis ao processo de reparo periimplantar. A molécula bioativa proposta neste estudo consiste na teriparatida, fármaco utilizado sistemicamente como anabólico ósseo e que é um análogo do paratormônio. Sabe-se que o paratormônio se liga a receptores presentes em osteoblastos, células diretamente responsáveis pelo processo de formação óssea. O processo de funcionalização da superfície dos implantes é realizado a partir da técnica de *layer by layer*, onde a partir da interposição de camadas com diferentes cargas elétricas, cria-se um substrato para que a molécula funcionalizadora (no caso, o anabólico ósseo) esteja localizada externamente à superfície do implante. A ideia implícita nesta tecnologia consiste na ação da teriparatida junto a receptores dos osteoblastos, ativando vias de sinalização que estimulam o processo de formação óssea, contribuindo com a aceleração do reparo periimplantar e melhora da qualidade do tecido ósseo que atuará como leito receptor para procedimentos reabilitadores que serão realizados na sequência.