



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JAQUELINE SILVA DOS SANTOS

Avaliação do comportamento de duas diferentes texturizações de superfície na osteogênese peri-implantar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e tratados com losartan

ARAÇATUBA - SP

2020

JAQUELINE SILVA DOS SANTOS

Avaliação do comportamento de duas diferentes texturizações de superfície na osteogênese peri-implantar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e tratados com losartan

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin.

ARAÇATUBA - SP

2020

ERRATA

SANTOS, S. J. **Avaliação do comportamento de duas diferentes texturizações de superfície na osteogênese peri-implantar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e tratados com losartan.** 37f. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
4	33		“Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado (processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011)”.

Aos meus pais, João e Madalena, por todo o esforço que fizeram para eu chegar até aqui. Às minhas irmãs, Janaína e Jéssica, que desde sempre foram minhas inspirações para trilhar este caminho. Muito obrigada por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Fábio**, o melhor presente que Araçatuba pôde me dar. Obrigada pelo companheirismo, pela cumplicidade que construímos e por nos dar a melhor cadelinha do mundo. Quero compartilhar todos os momentos com você. Te amo!

À minha orientadora, **Profª. Drª. Roberta Okamoto**, pela oportunidade de realizar esses anos de iniciação científica, pela paciência e por acreditar no meu potencial. Aprendi muito como pessoa e sobre a pesquisa. Sou imensamente grata pela receptividade que a senhora me proporcionou e que foi crucial para findar essa jornada.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin**, por coorientar este trabalho e por sempre deixar o ambiente com um bom humor.

À **Me. Bruna de Oliveira Reis**. Muito obrigada por ter sido tão acolhedora durante a minha chegada em Araçatuba, sou eternamente grata pelo que você e sua família fizeram por mim; vocês têm um coração enorme. Obrigada também por fazer parte dessa etapa final, te admiro muito.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Campos**, que mesmo pegando no meu pé, meu deu a oportunidade de realizar muitos procedimentos na disciplina de CTBMF; aprendi muito com o senhor! Muito obrigada pela disponibilidade de fazer parte dessa banca examinadora.

Aos amigos de graduação, **Amanda Scarpin, Amanda Maslem, Caroline Dousseau, Gabriel Carrijo, Giovanna Benini, Isabela Ferreira, Isadora David, Jéssica Santana, Juliana de Moura e Laura Coachman**. Obrigada pelo coleguismo e pelos bons momentos que me concederam nos diferentes anos da graduação. Vocês são especiais!

Aos amigos de iniciação científica, **Ana Carolina, Bruna Inoue, Carolina Wajima, Juliana de Moura, Tatiany Castro, Odir Filho e Paula Frigério**, às mestrandas, **Ana Cláudia, Letícia Pitol, Naara Monteiro, Natália Siqueira** e aos doutorandos, **Fábio Batista, Gabriel Mulinari e Pedro Ferreira**. Obrigada por toda a experiência compartilhada, por todos os aprendizados e pela harmonia.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara e vice-diretor Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos **docentes e funcionários desta instituição**, em especial, aos do Departamento de Ciências Básicas.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão das bolsas de iniciação científica (Processo nº: 2017/16912-0).

À empresa **Neodent**, pela fabricação e fornecimento dos implantes.

SANTOS, S. J. **Avaliação do comportamento de duas diferentes texturizações de superfície na osteogênese peri-implantar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e tratados com losartan.** 37f. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar as características morfológicas e funcionais do tecido ósseo peri-implantar, formado durante o processo de reparo, frente a instalação de implantes com diferentes tratamentos de superfície (Neoporos e Acqua), em ratos normotensos (*Wistar*) e espontaneamente hipertensos (SHR), tratados ou não com losartan. Sessenta e quatro ratos machos (32 *Wistar* e 32 SHR) foram divididos em 8 subgrupos: COA NEO (controle absoluto Neoporos), COA ACQ (controle absoluto Acqua), COL NEO (controle losartan Neoporos), COL ACQ (controle losartan Acqua), SHR NEO (SHR absoluto Neoporos), SHR ACQ (SHR absoluto Acqua), SHRL NEO (SHR losartan Neoporos) e SHRL ACQ (SHR losartan Acqua), sendo os correspondentes ao fármaco medicados diariamente. Foi realizada a cirurgia de instalação dos implantes Neoporos e Acqua nas tíbias dos animais. Aos 14 e 42 dias pós-operatórios, injetou-se o fluorocromo calceína e alizarina nos animais. Os animais foram submetidos à eutanásia 67 dias após o tratamento. As amostras coletadas foram dirigidas para as análises de imunoistoquímica, biomecânica, microtomografia computadorizada e microscopia confocal a laser. Como resultado, foi observado que as proteínas Osteocalcina (OC) e Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) tiveram expressão moderada no subgrupo SHRL ACQ, sendo o maior torque de remoção dos implantes também para este subgrupo. Quanto às características microarquiteturais, foi avaliado um maior número de trabéculas nos animais controles, tratados com losartan. Para a atividade de mineralização óssea, observou-se que a superfície Acqua desencadeou maiores valores para a MAR (Mineral Apposition Rate) nos grupos COA, COL e SHRL ($p < 0,05$). Concluiu-se que os dois tipos de texturizações apresentaram respostas semelhantes quanto às características do tecido ósseo peri-implantar, ainda que a superfície Acqua pareça melhorar as etapas iniciais da osseointegração.

Palavras-chave: Reparo ósseo. Tratamento de superfície. SHR. Losartan.

SANTOS, S. J. **Performance evaluation of two different surface texturing in the peri-implant osteogenesis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and treated with losartan.** 2020. 37p. Completion of Coursework (Graduation) - College of Dentistry - State University Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the morphological and dynamic characteristics of the peri-implant bone tissue formed during the healing process, through placement the implants with different surface treatments (Neoporos and Acqua), in normotensive rats (Wistar) and spontaneously hypertensive (SHR), treated or not with losartan. Sixty-four male rats (32 Wistar and 32 SHR) were divided into 8 subgroups: COA NEO (absolute control Neoporos), COA ACQ (absolute control Acqua), COL NEO (losartan control Neoporos), COL ACQ (losartan control Acqua), SHR NEO (SHR absolute Neoporos), SHR ACQ (SHR absolute Acqua), SHRL NEO (SHR losartan Neoporos) and SHRL ACQ (SHR losartan Acqua), the corresponding drugs were medicated daily. Neoporos and Acqua implants were installed into the animal's tibias. Fourteen and forty-two days after surgery, the fluorochromes calcein and alizarin were injected into the animals. The animals were euthanized 67 days after treatment. The collected samples were directed to analysis of immunohistochemistry, biomechanics, computed microtomography and laser confocal microscopy. As a result, it was observed that the proteins Osteocalcin (OC) and Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) had moderate expression in the SHRL ACQ subgroup, with the highest implant removal torque also for this subgroup. As for the microarchitectural characteristics, a greater number of trabeculae were evaluated in the control animals, treated with losartan and for bone mineralization activity. It was observed that the Acqua surface triggered higher values for MAR (Mineral Apposition Rate) in the COA, COL and SHRL groups ($p < 0.05$). It was concluded that the two types of textures presented similar responses regarding the characteristics of the peri-implant bone tissue, although the Acqua surface seems to improve the initial stages of osseointegration.

Keywords: Bone healing. Surface treatment. SHR. Losartan.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Divisão dos subgrupos experimentais	4
Tabela 2.	Biomecânica por torque de remoção (N.cm)	16
Tabela 3.	Volume ósseo (%)	16
Tabela 4.	Número de trabéculas (mm)	17
Tabela 5.	Espessura trabecular (mm)	17
Tabela 6.	Separação de trabéculas (mm)	17
Tabela 7.	Superfície ativa de mineralização (μm^2)	18
Tabela 8.	MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Processamento microtomográfico. Em A : Escaneamento da peça pelo microtomógrafo SkyScan 1272; B : Reconstrução pelo software NRecon; C : Orientação pelo software DataViwer e D : Quantificação dos parâmetros BV/TV, Tb.N, Tb.th e Tb.Sp pelo software CTAn.	7
Figura 2.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos COA NEO e COA ACQ. Em A : Área óssea marcada com calceína; B : Área óssea marcada com alizarina e C : Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.	9
Figura 3.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos COL NEO e COL ACQ. Em A : Área óssea marcada com calceína; B : Área óssea marcada com alizarina e C : Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.	9
Figura 4.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos SHR NEO e SHR ACQ. Em A : Área óssea marcada com calceína; B : Área óssea marcada com alizarina e C : Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.	10
Figura 5.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos SHRL NEO e SHRL ACQ. Em A : Área óssea marcada com calceína; B : Área óssea marcada com alizarina e C : Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.	10
Figura 6.	Imagens representativas da imunomarcção para OC	12
Figura 7.	Imagens representativas da imunomarcção para OPG	13
Figura 8.	Imagens representativas da imunomarcção para RANKL	14
Figura 9.	Imagens representativas da imunomarcção para VEGF	15

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Escores para a proteína OC	12
Gráfico 2.	Escores para a proteína OPG	13
Gráfico 3.	Escores para a proteína RANKL	14
Gráfico 4.	Escores para a proteína VEGF	15

LISTA DE ABREVIações

NaCl	Cloreto de Sódio
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
COA	Controle absoluto
COL	Controle losartan
SHR	SHR absoluto
SHRL	SHR losartan
COA NEO	Controle absoluto com instalação de implantes Neoporos
COA ACQ	Controle absoluto com instalação de implantes Acqua
COL NEO	Controle losartan com instalação de implantes Neoporos
COL ACQ	Controle losartan com instalação de implantes Acqua
SHR NEO	SHR absoluto com instalação de implantes Neoporos
SHR ACQ	SHR absoluto com instalação de implantes Acqua
SHRL NEO	SHR losartan com instalação de implantes Neoporos
SHRL ACQ	SHR losartan com instalação de implantes Acqua
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CitriSolv	Solvente à base de d-Limoneno
PBS	Solução tampão fosfato-salina
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Receptor Nuclear Kappa B Ligante
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
BV/V	Volume ósseo
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
Tb.Sp	Separação de trabéculas
MAR	Mineral Apposition Rate; Taxa de aposição mineral diária
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
ALP	Fosfatase alcalina

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivo	2
3. Materiais e Métodos	3
3.1 Grupos Experimentais	3
3.2 Administração de losartan e registro da pressão arterial	3
3.3 Instalação dos implantes e subdivisão dos grupos	3
3.4 Aplicação dos fluorocromos	5
3.5 Eutanásia	5
3.6 Imunoistoquímica	5
3.7 Análise Biomecânica	6
3.8 Microtomografia Computadorizada	6
3.9 Microscopia Confocal a Laser	7
3.10 Análise Estatística	11
4. Resultados	12
4.1 Imunoistoquímica	12
4.1.1 Osteocalcina (OC)	12
4.1.2 Osteoprotegerina (OPG)	13
4.1.3 Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL)	14
4.1.4 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)	15
4.2 Análise Biomecânica	15
4.3 Microtomografia Computadorizada	16
4.4 Microscopia Confocal a Laser	18
4.4.1 Superfície Ativa de Mineralização	18
4.4.2 MAR	18
5. Discussão	19
6. Conclusão	22
Referências	23
ANEXOS	26

1. Introdução

A hipertensão arterial é uma alteração sistêmica que acomete grande parte da população, com índice de prevalência de um a cada três adultos jovens.¹ Além das alterações cardiovasculares, indivíduos hipertensos apresentam concentrações plasmáticas inferiores de cálcio e vitamina D, precursores essenciais para a manutenção do metabolismo ósseo.^{2,3}

O sistema renina-angiotensina é um importante regulador fisiológico da pressão arterial, atuando, por muitas vezes, diretamente na etiopatogenia desta condição. Consequentemente, quando em desequilíbrio, eleva os valores de pressão sistólica e diastólica por efeitos sobre a resistência periférica arterial (relacionada à pressão diastólica) e retenção de líquidos. Muitas substâncias que atuam na regulação desse sistema têm sido utilizadas para o tratamento da hipertensão, dentre elas, destaca-se o losartan.⁴⁻⁶ O losartan é um fármaco amplamente utilizado por indivíduos hipertensos devido a sua eficácia e por ser praticamente isento de efeitos colaterais; atua bloqueando os receptores AT1 da angiotensina II, diminuindo a vasoconstrição e a secreção de aldosterona, reduzindo a níveis normais a pressão arterial alterada.^{7,8} Indiretamente, essa medicação intervém no metabolismo ósseo em razão de seu efeito sobre o sistema OPG/RANKL; estudos demonstram a ação positiva do losartan em relação ao contato osso-implante, reparo alveolar e à diminuição de perda óssea periodontal e da movimentação ortodôntica em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).⁹⁻

13

Devido à demanda por reabilitação estética e funcional através de implantes dentários, um recurso utilizado para acelerar e otimizar o processo de osseointegração é o uso de tratamentos de superfície sobre os implantes.^{14,15} Dentre os diferentes tipos de tratamentos utilizados, superfícies modificadas por jateamento abrasivo e condicionamento ácido, mantidas em solução de NaCl (hidrofílicas), são amplamente empregadas no protocolo clínico, uma vez que as alterações físico-químicas propostas por este tipo de tratamento aprimoram a molhabilidade e hidrofiliabilidade do implante, potencializando a adesão e manutenção do coágulo sanguíneo, favorecendo o início do processo de osseointegração.¹⁶⁻¹⁸ A associação entre este diferente tipo de tratamento de superfície e o losartan poderia atuar sinergicamente sobre o processo de reparo peri-implantar, prejudicado na hipertensão.

2. Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar a osseointegração de implantes, com diferentes tratamentos de superfície (Neoporos e Acqua), instalados em tíbias de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com losartan, através das análises por imunoistoquímica, biomecânica, microtomografia computadorizada e dinâmica óssea por fluorocromos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Grupos Experimentais

Após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo nº 00404-2016) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2017/16912-0), foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus), sendo 32 normotensos e 32 espontaneamente hipertensos (SHR), de 16 semanas de vida, com peso aproximado de 350 g. Os animais foram mantidos em gaiolas num ambiente com temperatura estável ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz controlado (12 horas de luz, 12 horas no escuro), com alimentação balanceada (Ração Mogiana Alimentos SA, Campinas, SP, Brasil) e quantidades controladas de água. Estes foram divididos em quatro grupos, de acordo com o uso ou não do fármaco: COA (controle absoluto), COL (controle losartan), SHR (SHR absoluto) e SHRL (SHRL losartan).^{9, 10}

3.2 Administração de losartan e registro da pressão arterial

O tratamento medicamentoso se iniciou 7 dias antes da instalação dos implantes. O losartan (Biosintética, São Paulo, SP, Brasil) foi diariamente diluído na água de beber dos animais, numa concentração de 30 mg por kg de peso corporal.¹⁹ A pressão arterial sistólica foi verificada por pletismografia caudal indireta, através do pletismógrafo Physiograph®, MK-III-S (Narco Bio-systems, Houston, TX), adaptado para medidas em ratos.^{19,20} A medicação não alterou a pressão sanguínea dos animais normotensos e controlou a dos hipertensos. A administração de losartan e a pletismografia caudal indireta foram realizados até o dia da eutanásia.^{9, 10}

3.3 Instalação dos implantes e subdivisão dos grupos

Sete dias após o início do tratamento medicamentoso, os animais permaneceram em jejum pré-operatório de 8 horas, para serem anestesiados com uma combinação de 50 mg/kg de cetamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health Ltda.; Campinas, SP, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser - Laboratórios Calier do Brasil Ltda.; Osasco, SP, Brasil), via intramuscular.²¹ Foi realizada a tricotomia, seguida da antisepsia com iodopovidona tópico

(10% PVP-I, Degeneração de Riodeine Soft Derma, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na região das metáfises tibiais de cada animal. Através de uma incisão de 3 cm, os tecidos moles foram avulsionados até a exposição da área óssea de interesse. Com uma fresa de 1,5 mm de diâmetro acoplada ao motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil), na velocidade de 1.000 rpm, sob irrigação isotônica NaCl 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda.; Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi confeccionado o defeito cirúrgico da região. Manualmente, através de uma chave digital, implantes de titânio grau 4, com diâmetro de 1,5 mm e 3,5 mm de comprimento, foram instalados em cada tibia dos animais, de acordo com o tratamento de superfície: as tíbias esquerdas receberam implantes de jateamento abrasivo – Neoporos (Neodent, Curitiba, PR, Brasil), enquanto que as tíbias direitas receberam implantes com tratamento de superfície hidrofílica – Acqua (Neodent, Curitiba, PR, Brasil). Na camada profunda, as feridas cirúrgicas foram suturadas com fio reabsorvível (Poliglactina 910 - Vicryl 4.0, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e na externa, com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). No pós-operatório imediato, foi administrada uma injeção intramuscular de pentabiótico (0,1 ml/kg; Fort Dodge Saúde Animal Ltda.; Campinas, SP, Brasil) e dipirona sódica (1 mg/kg; Ariston, Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda.; São Paulo, SP, Brasil) em cada animal.^{9, 21}

Após o procedimento cirúrgico, tornou-se necessária a atribuição de dois subgrupos inseridos em cada um dos grupos denominados anteriormente, de acordo com o tipo de tratamento de superfície dos implantes (Neoporos ou Acqua) instalados (Tabela 1).

Tabela 1 – Divisão dos subgrupos experimentais

			<i>Grupos e Subgrupos</i>							
<i>Análise</i>	n	Tíbias	COA		COL		SHR		SHRL	
			COA NEO	COA ACQ	COL NEO	COL ACQ	SHR NEO	SHR ACQ	SHRL NEO	SHRL ACQ
Imunoistoquímica	16	32	4	4	4	4	4	4	4	4
Biomecânica	24	48	6	6	6	6	6	6	6	6
Microtomografia Computadorizada Microscopia Confocal a Laser	24	48	6	6	6	6	6	6	6	6

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Divisão das análises em subgrupos, de acordo com a interferência sistêmica e uso ou não de losartan, e instalação dos implantes Neoporos (NEO) e Acqua (ACQ).

3.4 Aplicação dos fluorocromos

Aos 14 dias pós-operatórios, foi administrado em cada animal da análise por Microtomografia Computadorizada e Microscopia Confocal a Laser (n=24), por via intramuscular (20 mg/kg), o fluorocromo calceína. Passados 28 dias (42 dias pós-operatórios), foi administrada, na mesma dose, a injeção do fluorocromo vermelho de alizarina nestes mesmos animais.²¹⁻²³ Ambos os fluorocromos indicam, respectivamente, a deposição de osso antigo e osso recém-formado.^{10, 21}

3.5 Eutanásia

Sessenta dias após a instalação dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (150 mg/kg, Tiopental Cristália Ltda.; Itapira, SP, Brasil).^{9, 10, 21}

3.6 Imunoistoquímica

Para esta análise, parte das peças coletadas foram fixadas em solução de formaldeído 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda.; Catanduva, SP, Brasil), por 48 horas e lavadas em água corrente, por 24 horas. Posteriormente, estas foram descalcificadas em solução de EDTA 10%, por 20 semanas, desidratadas numa sequência crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. As peças foram incluídas em parafina e os blocos obtidos foram processados em cortes de 5 µm pelo micrótomo (Leica Biosystems – RM2125 RTS, Heerbrugg, Suíça) para serem inseridos em lâminas histológicas. O processamento imunoistoquímico iniciou-se pela desparafinização, seguida de banhos em CitriSolv (Decon Labs, Inc.; King of Prussia, PA, EUA) e banhos em concentrações decrescentes de álcoois, finalizados com a hidratação dos cortes imersos em PBS 0,01M. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e, na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0), em calor úmido. Foi realizado o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado; ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina 1%. Os anticorpos primários (anticorpos policlonais, produzidos em cabra) utilizados foram contra a Osteocalcina (OC) (SC18319, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX, EUA), para caracterizar o grau de mineralização e avanço da maturidade do tecido ósseo, Osteoprotegerina (OPG) (SC21038, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX, EUA) e Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL) (SC7627,

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX, EUA), para avaliar o turnover na interface osso-implante e, por fim, contra o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (SC7269, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX, EUA), para evidenciar o aporte sanguíneo da região de interesse. O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anti-cabra, produzido em coelhos (Histofine® - Immunohistochemical staining reagent, San Diego, CA, USA). A sinalização da reação foi amplificada através da incubação em avidina e biotina e posteriormente revelada pela diaminobenzidina (Dako Omnis - Agilent Dako, Santa Clara, CA, EUA). Ao término das reações imunoistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Burlington, MA, EUA). Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas em xilol e as lamínulas foram montadas nas respectivas lâminas. A captura de imagens foi realizada através do microscópio óptico (Leica Microsystems DMLB, Heerbrugg, Switzerland), e para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas por análise qualitativa ordinal, através da atribuição de diferentes escores, de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de osseointegração. Foi caracterizada a imunomarcagem para diferentes proteínas que sinalizam o processo de formação e mineralização óssea, com os escores de 0 (ausência de marcação), 1 (marcação leve), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação intensa).²⁰⁻²³

3.7 Análise Biomecânica

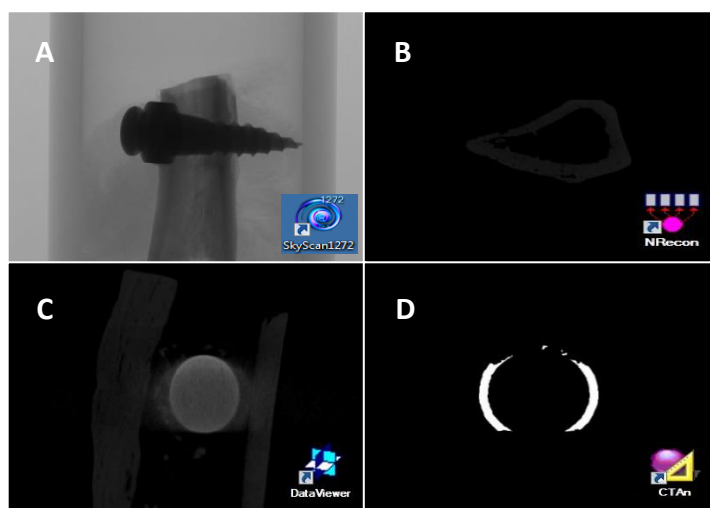
A chave hexagonal do torquímetro digital (Conexão, São Paulo, SP, Brasil) foi acoplada ao implante, aplicando-se um movimento no sentido anti-horário, gerando um torque reverso, até que este se soltasse de dentro do tecido ósseo. O dispositivo registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).^{9, 24}

3.8 Microtomografia Computadorizada

As tíbias foram coletadas, reduzidas e fixadas em formaldeído 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda.; Catanduva, SP, Brasil), por 48 horas, lavadas em água corrente, por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Cada peça foi escaneada pelo microtomógrafo (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica), em cortes de 6 µm (70 Kv e 142 µA), utilizando filtro de Al 0,5 mm, passo de rotação de 0,4 mm e resolução de 2016 x 1344 µm, completando o tempo de 1h e 36 minutos para a aquisição das projeções. Na sequência, as regiões de interesse das projeções de raios-x obtidas foram reconstruídas pelo

software NRecon (Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica), atribuindo-se suavização de 5, correção dos artefatos dos anéis de 7, correção do feixe em 40% e intervalo de correção das imagens de 0,0 a 0,46. Em seguida, as reconstruções foram analisadas em três planos (transversal, sagital e longitudinal) no software DataViewer (Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica) e orientadas no plano sagital para elaboração do conjunto de dados. Posteriormente, foram analisados e definidos valores para o contato osso-implante (região de interesse), no software CTAn (Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica), aos parâmetros: volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e separação de trabéculas (Tb.Sp) (Figura 1).²⁵

Figura 1 – Processamento microtomográfico



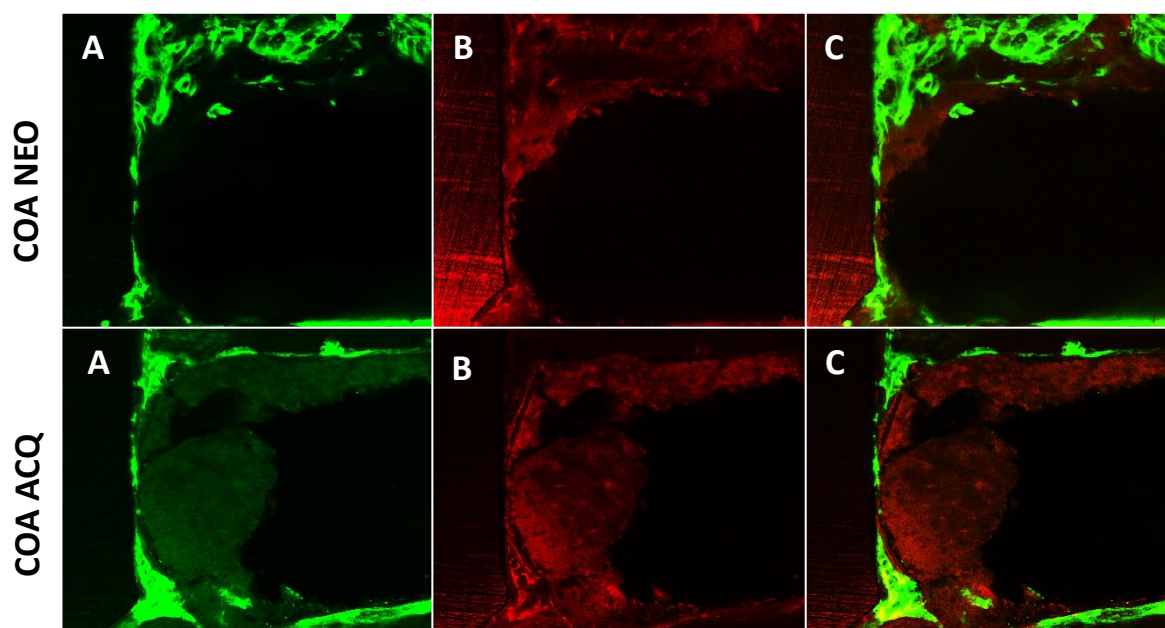
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Em **A**: Escaneamento da peça pelo microtomógrafo SkyScan 1272; **B**: Reconstrução pelo software NRecon; **C**: Orientação pelo software DataViewer e **D**: Quantificação dos parâmetros BV/TV, Tb.N, Tb.th e Tb.Sp pelo software CTAn.

3.9 Microscopia Confocal a Laser

Após a análise por microtomografia computadorizada, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir de uma sequência crescente de álcoois. Ao término desta desidratação, as peças foram imersas numa mistura de álcool 100% e metilmetacrilato termopolimerizável (JET, Artigos Odontológicos Clássico Ltda.; São Paulo, SP, Brasil), em diferentes concentrações. Após a desidratação final das peças calcificadas, estas foram incluídas em resina termopolimerizável (Techno Vit® 7200 VLC, Heraeus Kulzer, GmbH Divisão Técnica, Philipp-Reis-Str. 13/8 D-61273, Wehrheim, Alemanha) e acrilizadas. Após a polimerização da resina, as peças foram inicialmente desgastadas por broca maxicut.

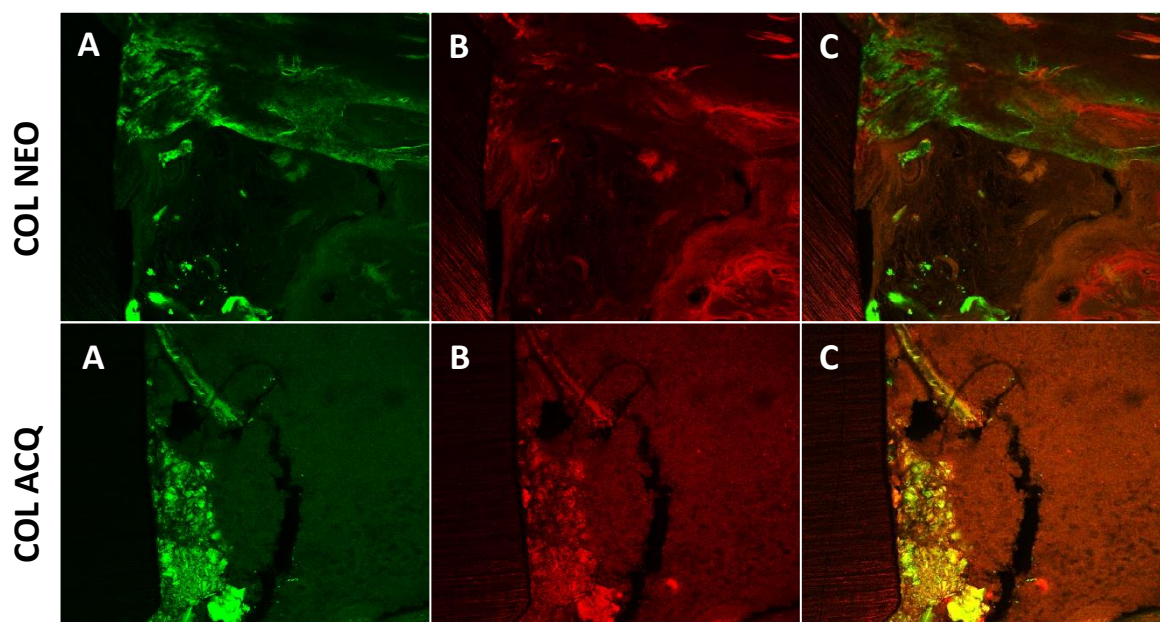
Posteriormente, estas foram submetidas ao desgaste manual através de lixas de granulação em ordem decrescente, na Politriz (Arotec S/A Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil) até a obtenção de 100 μm de espessura nos cortes. Estes mesmos cortes foram confinados em lâminas histológicas a partir de lamínulas. Através do microscópio Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando a objetiva de 10 X (aumento original 100), foram capturadas as secções longitudinais da região de interface osso-implante correspondentes a área de tecido ósseo medular, excluindo-se as áreas referentes ao osso cortical de cada tíbia; portanto, o implante foi tomado como referência, e então, a área do tecido ósseo medular adjacente a este foi avaliada em cada amostra. As imagens obtidas foram reconstruídas e assim, o osso medular apresentou a sobreposição dos dois fluorocromos (calceína e vermelho de alizarina). Estas imagens foram transportadas para o software ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, ON, Canadá). Neste programa, por meio da ferramenta “color threshold”, cada imagem correspondente aos grupos experimentais foi padronizada de acordo com a matiz, saturação e brilho, para evidenciação dos fluorocromos analisados. Primeiramente, a cor verde foi evidenciada (calceína) e pela ferramenta “measure” o programa forneceu a área correspondente em μm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para a cor vermelha (alizarina), obtendo-se os dados referentes à dinâmica do tecido ósseo peri-implantar. Nesta abordagem metodológica, a precipitação de osso novo, foi denominada “superfície ativa de mineralização”, representada pela alizarina. Para obtenção da taxa de aposição mineral diária (MAR – Mineral Apposition Rate) da área de fluorocromos, as imagens foram novamente transportadas ao software ImageJ para a padronização individual. A ferramenta “straight” foi selecionada e foram traçadas 4 linhas entre o início da precipitação de alizarina (marcação vermelha) até o final da precipitação de calceína (marcação verde); os valores foram divididos por 28, número que remete o período de dias entre as injeções de calceína e alizarina, representando a precipitação diária do cálcio (Figuras 2 a 5).^{10, 21, 22, 26}

Figura 2 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos COA NEO e COA ACQ



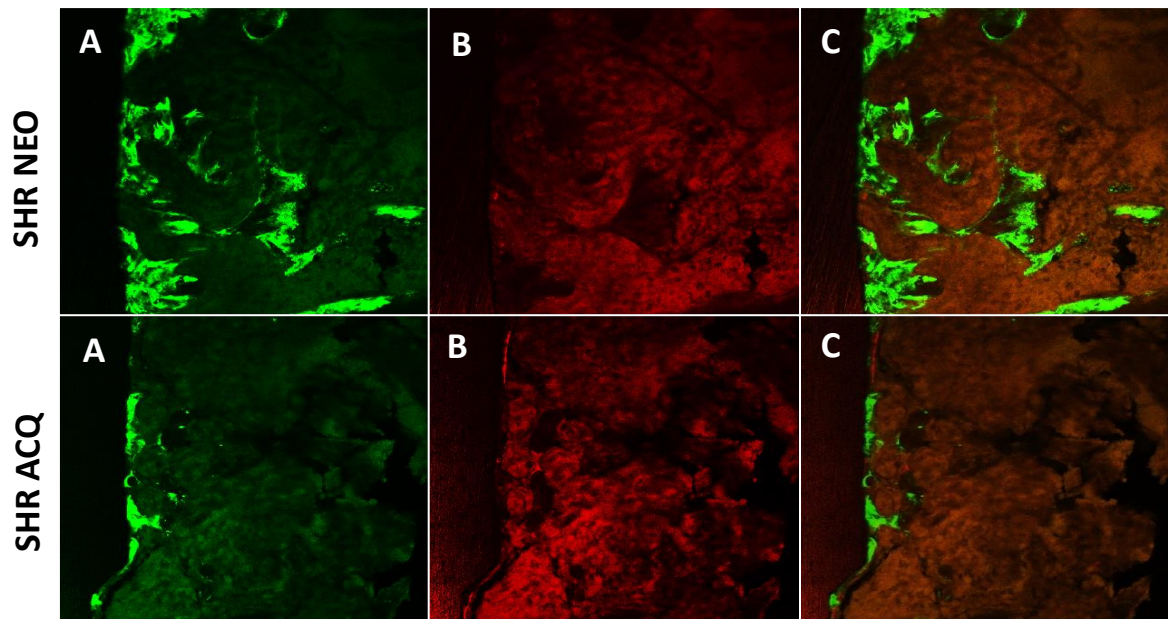
Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Em **A**: Área óssea marcada com calceína; **B**: Área óssea marcada com alizarina e **C**: Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.

Figura 3 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos COL NEO e COL ACQ



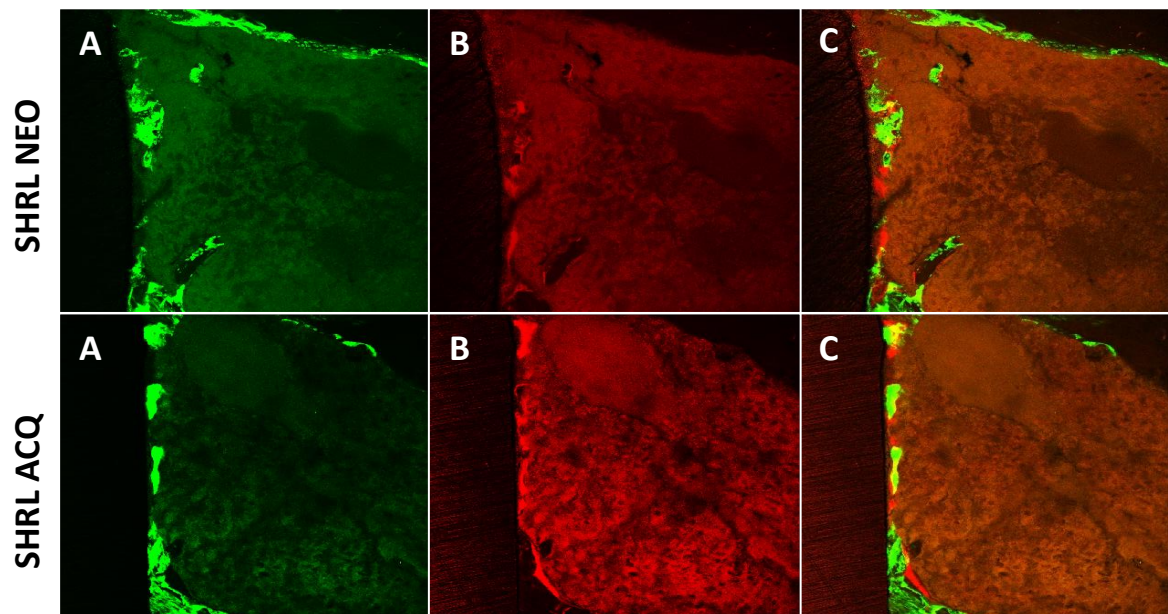
Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Em **A**: Área óssea marcada com calceína; **B**: Área óssea marcada com alizarina e **C**: Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.

Figura 4 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos SHR NEO e SHR ACQ



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Em **A**: Área óssea marcada com calceína; **B**: Área óssea marcada com alizarina e **C**: Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.

Figura 5 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para os subgrupos SHRL NEO e SHRL ACQ



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Em **A**: Área óssea marcada com calceína; **B**: Área óssea marcada com alizarina e **C**: Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos.

3.10 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism 7.03 (Software GraphPad; La Jolla; EUA). Para os parâmetros quantitativos obtidos da análise biomecânica e taxa de aposição mineral diária (MAR, da análise por microscopia confocal a laser), foram aplicados testes de normalidade e homoscedasticidade (Shapiro-Wilk), a fim da verificação de distribuição dos dados. Após a confirmação da distribuição normal dos dados, foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações, quando necessário, em todas as análises realizadas. Para todos os testes, o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

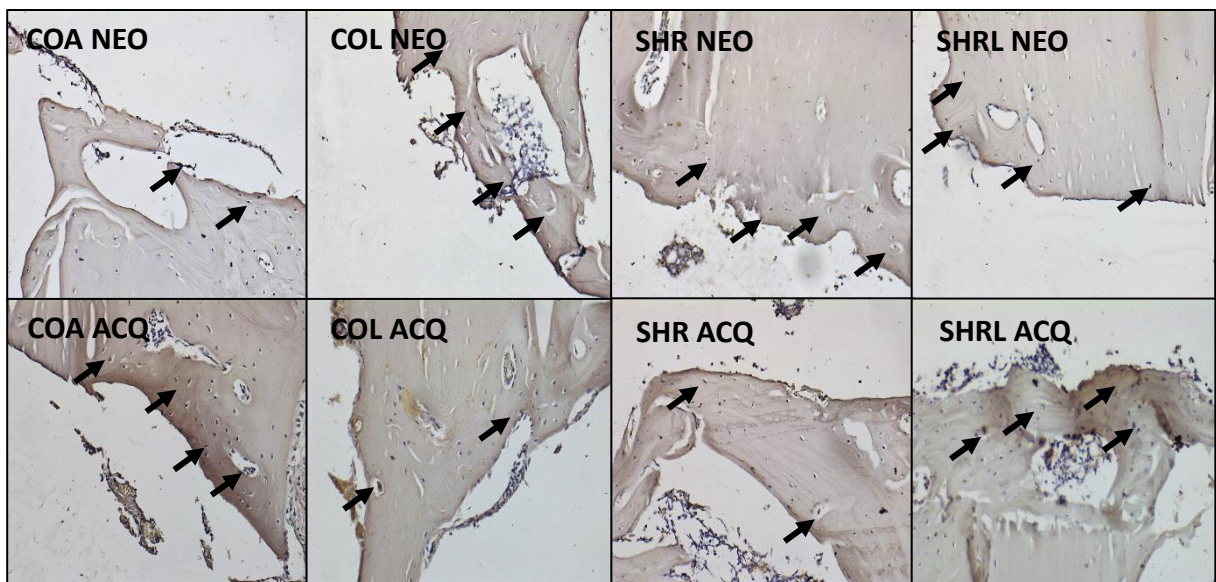
4. Resultados

4.1 Imunoistoquímica

4.1.1 Osteocalcina (OC)

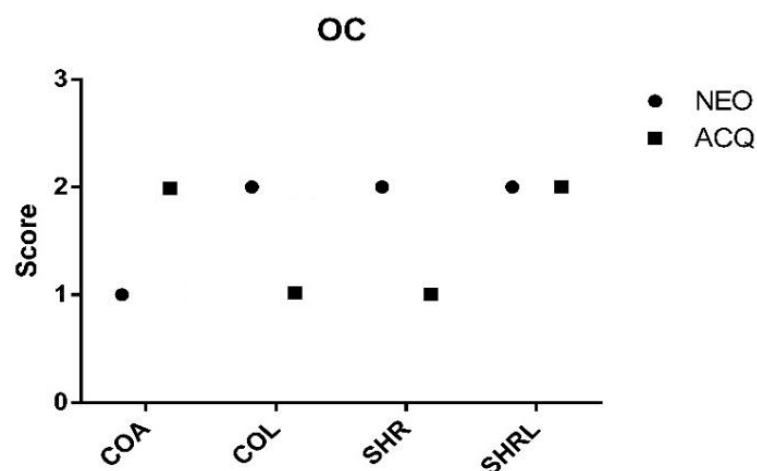
Aos 60 dias pós-operatórios, a expressão de OC apresentou marcação leve (1) para os subgrupos COA NEO, COL ACQ e SHR ACQ, enquanto que a expressão para os subgrupos COA ACQ, COL NEO, SHR NEO, SHRL NEO e SHRL ACQ foi moderada (2), caracterizando um melhor grau de mineralização do tecido ósseo (Figura 6 e Gráfico 1).

Figura 6 – Imagens representativas da imunomarcação para OC



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Imunomarcação de OC em todos os subgrupos experimentais.

Gráfico 1 – Escores para a proteína OC

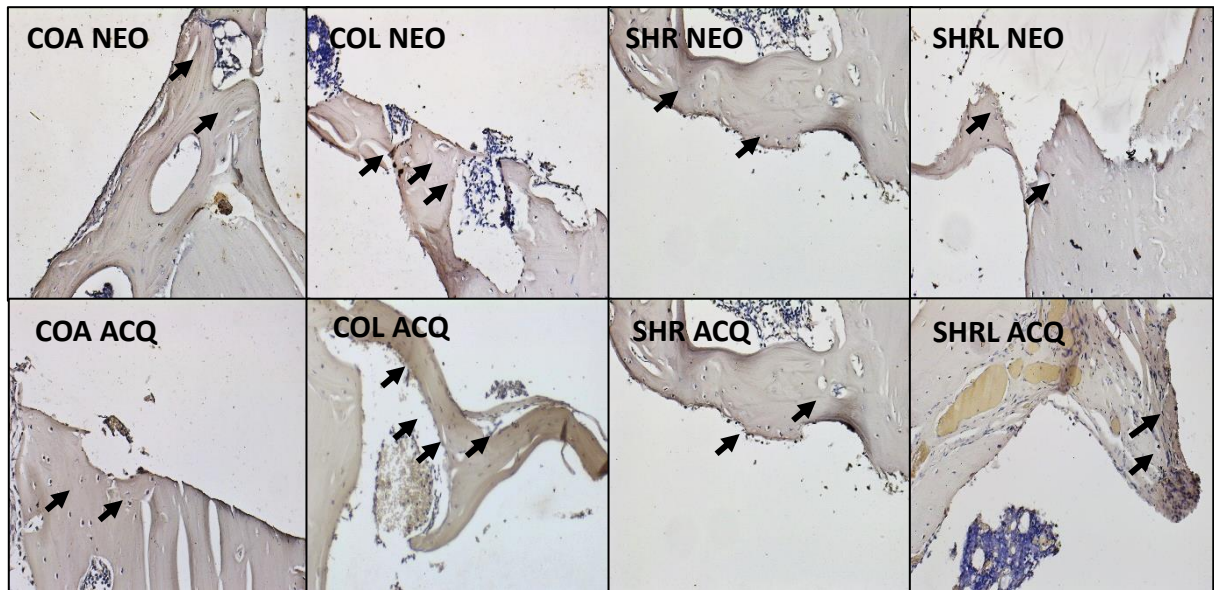


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Escores, por análise qualitativa ordinal, para imunomarcação de OC.

4.1.2 Osteoprotegerina (OPG)

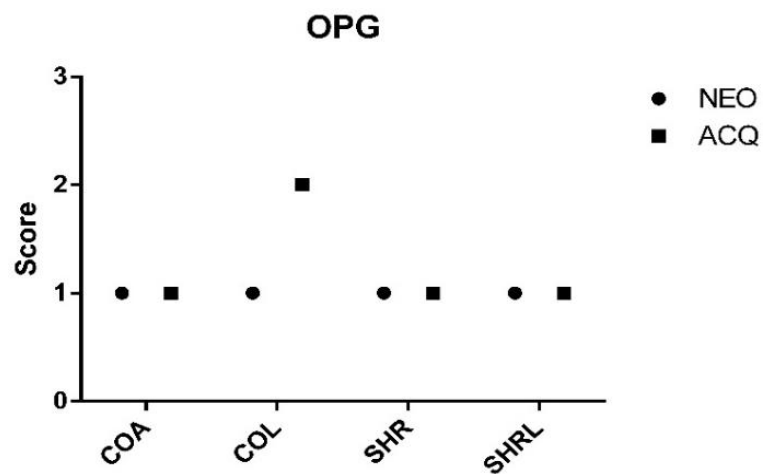
A expressão de OPG obteve marcação leve (1) para os subgrupos COA NEO, COA ACQ, COL NEO, SHR NEO, SHR ACQ, SHRL NEO e SHRL ACQ; a expressão foi moderada (2) somente para COL ACQ, evidenciando uma diminuição da ação osteoclástica para este subgrupo (Figura 7 e Gráfico 2).

Figura 7 – Imagens representativas da imunomarcação para OPG



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Imunomarcação de OPG em todos os subgrupos experimentais.

Gráfico 2 – Escores para a proteína OPG

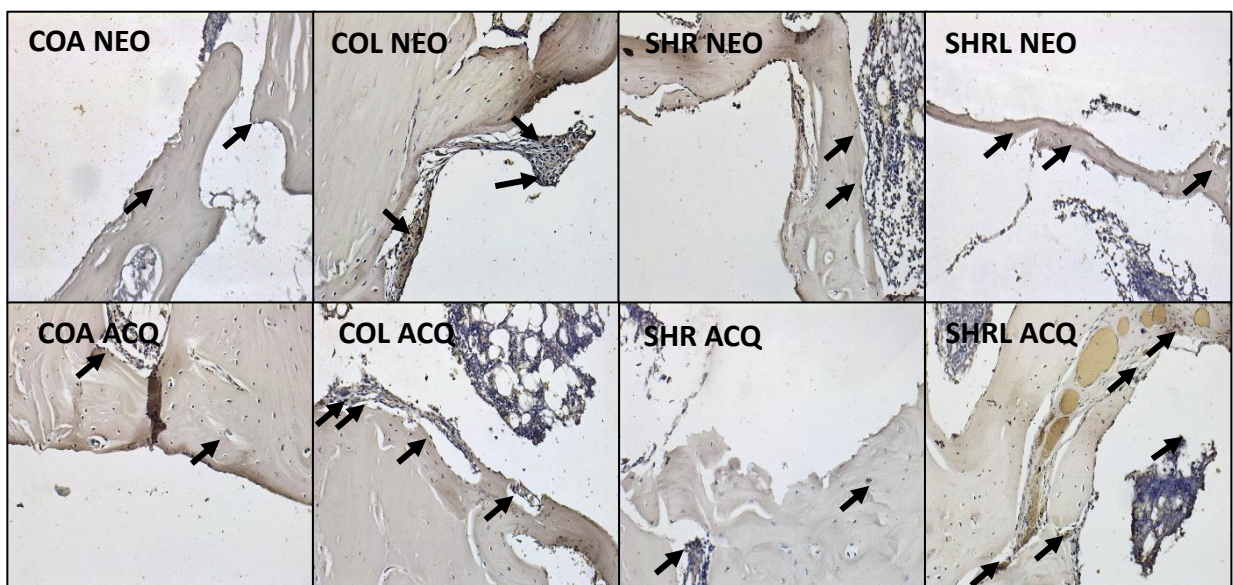


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Escores, por análise qualitativa ordinal, para imunomarcação de OPG.

4.1.3 Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL)

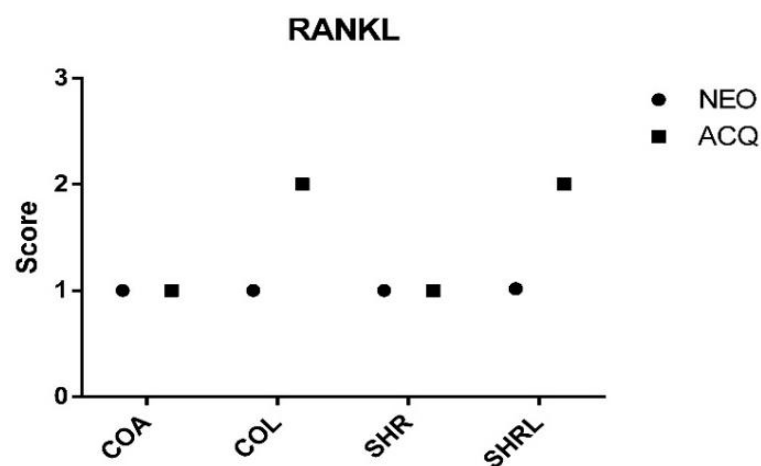
Para RANKL, evidenciou-se marcação leve (1) para os subgrupos COA NEO, COA ACQ, COL NEO, SHR NEO, SHR ACQ e SHRL NEO; quanto aos subgrupos COL ACQ e SHRL ACQ, a expressão foi moderada (2) (Figura 8 e Gráfico 3), demonstrando que o subgrupo COL ACQ apresenta um equilíbrio na remodelação óssea, uma vez que também obteve marcação moderada para OPG; sugere-se ainda que o losartan e a superfície Acqua não apresentem um potencial contra a osteoclastogênese induzida pela ativação de RANKL, embora a expressão de OC para o subgrupo SHRL ACQ também tenha sido moderada, não comprometendo a deposição da matriz mineral óssea.

Figura 8 – Imagens representativas da imunomarcacão para RANKL



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Imunomarcacão de RANKL em todos os subgrupos experimentais.

Gráfico 3 – Escores para a proteína OPG

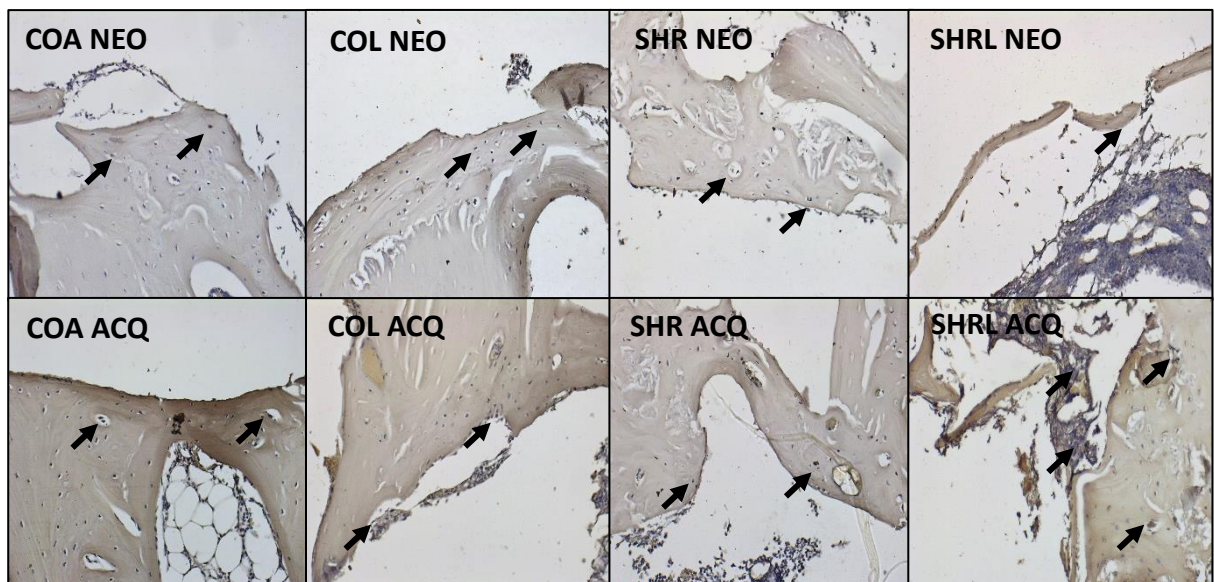


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Escores, por análise qualitativa ordinal, para imunomarcacão de RANKL.

4.1.4 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

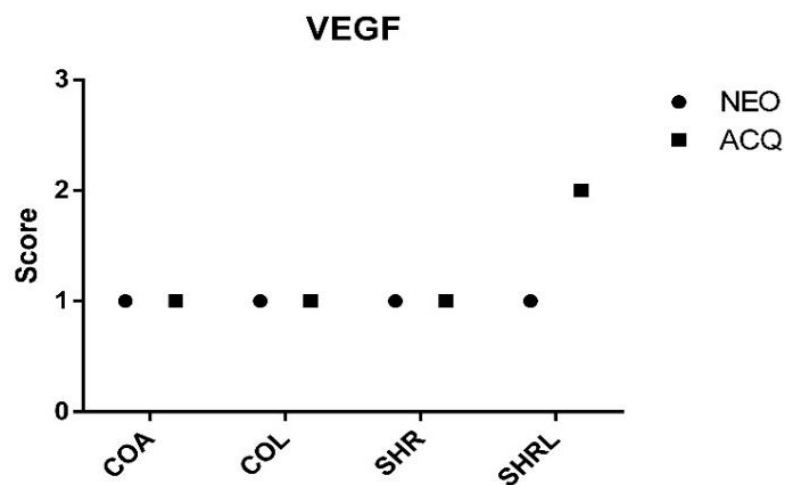
A marcação para VEGF foi leve (1) para os subgrupos COA NEO, COA ACQ, COL NEO, COL ACQ, SHR NEO, SHR ACQ e SHRL NEO, expressando-se como moderada (2) apenas para o subgrupo SHRL ACQ (Figura 9 e Gráfico 4), o que sugere que tanto o fármaco quanto a superfície Acqua possam proporcionar uma melhor angiogênese ao tecido ósseo hipertenso, melhorando o aporte sanguíneo da região peri-implantar para a aposição da matriz mineral óssea, o que corrobora com o resultado achado para este subgrupo quanto à expressão moderada de OC.

Figura 9 – Imagens representativas da imunomarcação para VEGF



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Imunomarcação de VEGF em todos os subgrupos experimentais.

Gráfico 4– Escores para a proteína VEGF



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Escores, por análise qualitativa ordinal, para imunomarcação de VEGF.

4.2 Análise Biomecânica

Foi observado um aumento no torque de remoção dos implantes do subgrupo SHRL ACQ (10,1 N.cm) quando comparado aos demais ($p < 0,05$). Vale ainda ressaltar que o losartan possa ter favorecido o torque de remoção dos implantes, visto que os subgrupos controles tratados (COL NEO e COL ACQ) obtiveram melhores valores que os subgrupos controles absolutos (COA NEO e COA ACQ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Biomecânica por torque de remoção (N.cm)

<i>Grupo</i>	<i>Superfície</i>	
	NEOPOROS	ACQUA
COA	5,9	2,8 ^{a, b}
COL	6,4	3,3 ^{c, d}
SHR	9,4 ^{a, c, e}	4,4 ^{e, f}
SHRL	5,1	10,1 ^{b, d, f}

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Maior torque de remoção para SHRL ACQ em relação a todos os outros subgrupos – One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3 Microtomografia Computadorizada

Não foram apontadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tipos de tratamento de superfície. No entanto, o número de trabéculas aumentou no grupo controle tratado (COL) quando comparado ao grupo controle não tratado (COA) ($p < 0,05$), validando os efeitos anabólicos do losartan sobre o tecido ósseo, uma vez que há maior separação de trabéculas para COA ($p < 0,05$) e maior porcentagem de volume ósseo para COL, em ambas as superfícies (NEO 56,21584% e ACQ 54,09387%) (Tabelas 3 a 6).

Tabela 3 – Volume ósseo (%)

<i>Grupo</i>	<i>Superfície</i>	
	NEOPOROS	ACQUA
COA	52,85623	53,12093
COL	56,21584	54,09387
SHR	52,60293	52,54877
SHRL	52,68403	51,70204

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Volume ósseo (BV/TV).

Tabela 4 – Número de trabéculas (mm)

<i>Superfície</i>		
<i>Grupo</i>	NEOPOROS	ACQUA
COA ^a	3,35317	3,35309
COL ^{a,b}	3,64344	3,52362
SHR	3,45987	3,34485
SHRL ^b	3,32377	3,27599

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Número de trabéculas (Tb.N) – Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Espessura trabecular (mm)

<i>Superfície</i>		
<i>Grupo</i>	NEOPOROS	ACQUA
COA	0,15754	0,15839
COL	0,15452	0,15366
SHR	0,15214	0,15711
SHRL	0,15852	0,15779

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Espessura trabecular (Tb.Th).

Tabela 6 – Separação de trabéculas (mm)

<i>Superfície</i>		
<i>Grupo</i>	NEOPOROS	ACQUA
COA ^a	0,15943	0,16111
COL ^a	0,15106	0,15407
SHR	0,15411	0,15661
SHRL	0,15605	0,15589

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Separação de trabéculas (Tb.Sp) – Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Microscopia Confocal a Laser

4.4.1 Superfície Ativa de Mineralização

Todos os grupos apresentaram uma média semelhante para a precipitação de cálcio referente a área marcada pelo fluorocromo vermelho de alizarina. Os subgrupos COA ACQ ($1,3511 \mu\text{m}^2$) e SHR ACQ ($1,3421 \mu\text{m}^2$) apresentaram valores semelhantes, sugerindo que esta superfície propicie alterações pós-operatórias iniciais na osseointegração (Tabela 7).

Tabela 7 – Superfície ativa de mineralização (μm^2)

<i>Superfície</i>		
<i>Grupo</i>	NEOPOROS	ACQUA
COA	1,1075	1,3511
COL	1,1989	1,1121
SHR	1,4761	1,3421
SHRL	1,4811	1,1491

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Precipitação do fluorocromo vermelho de alizarina.

4.4.2 MAR

Houve diferença estatisticamente significativa para os diferentes tratamentos de superfície ($p < 0,05$) em relação à taxa de aposição mineral diária (MAR), indicando valores superiores para a superfície Acqua nos grupos COA, COL e SHRL (Tabela 8).

Tabela 8 – MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)

<i>Superfície</i>		
<i>Grupo</i>	NEOPOROS	ACQUA
COA	337,3 ^a	580,1 ^{b, c}
COL	244,1 ^{b, d, e, f}	661,1 ^{a, d, g}
SHR	487,1	304,6 ^{c, g, h, i}
SHRL	571,5 ^{e, h}	588,9 ^{f, i}

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019). Melhor taxa de aposição mineral diária para a superfície Acqua nos grupos controle e para o grupo hipertenso tratado com losartan – One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. Discussão

O processo de reparo ósseo apresenta um retardo em sua cronologia em animais SHR quando comparados a ratos *Wistar*.^{19, 20} O questionamento deste estudo foi se diferentes tratamentos de superfície poderiam melhorar o reparo ósseo peri-implantar nos modelos experimentais de osso comprometido por hipertensão tratado ou não tratado com o anti-hipertensivo escolhido.

A Angiotensina II age diretamente na regulação da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina, além de interferir indiretamente no metabolismo ósseo, uma vez que se liga nos receptores AT1 de osteoblastos, incitando a expressão de RANKL.^{4, 6, 19} Os achados imunoistoquímicos deste estudo corroboram com o aumento da expressão de RANKL para o subgrupo hipertenso tratado com losartan e instalação do implante de superfície Acqua (SHRL ACQ), como também, uma menor expressão (leve) para a proteína Osteoprotegerina (OPG), evidenciando um maior nível de reabsorção óssea para este subgrupo, embora o mesmo apresente um nível de expressão moderada para a condução da mineralização da matriz óssea, representada pela proteína Osteocalcina (OC), sugerindo que o losartan e a superfície Acqua beneficiem a qualidade do tecido ósseo comprometido, uma vez que este subgrupo, numericamente, possui elevada espessura trabecular, confirmada pela análise microtomográfica.

No subgrupo controle tratado com losartan e instalação do implante de superfície Acqua (COL ACQ), houve uma expressão moderada para RANKL e OPG, exibindo um melhor turnover ósseo para este subgrupo devido ao equilíbrio entre estas proteínas. Ainda que para COL ACQ a expressão de OC, que representa a formação da matriz óssea, tenha sido leve, a literatura sugere que a superfície Acqua possa promover vantagem para o reparo ósseo peri-implantar, como apontado num estudo que concluiu que implantes de superfície hidrofílica (Acqua) aumentaram a expressão da proteína BMP-2 aos 45 dias pós-operatórios em áreas enxertadas em tíbias de ratos, além do aumento da expressão de ALP para esta mesma superfície e área, aos 15 dias pós-operatórios.¹⁸

Quanto à expressão de VEGF, a marcação moderada para o subgrupo SHRL ACQ explicita que o tratamento medicamentoso associado à superfície Acqua possa oferecer vantagem para osseointegração de implantes instalados em tecido ósseo comprometido, uma

vez que o aumento da angiogênese local favoreceria, conseqüentemente, a matriz óssea neoformada na interface osso-implante.

Com certa heterogeneidade dos dados da análise biomecânica para os subgrupos controles, tanto tratados quanto não tratados (COA NEO, COA ACQ, COL NEO e COL ACQ), nota-se que as superfícies Neoporos e Acqua proporcionam semelhante estabilidade do implante aos 60 dias pós-operatórios. Já para os subgrupos hipertensos tratados e não tratados com losartan (SHR NEO, SHR ACQ, SHRL NEO e SHRL ACQ), houve uma diferença peculiar entre os diferentes tratamentos de superfície propostos por este estudo: enquanto que a superfície Neoporos viabilizou uma melhor estabilidade em SHRs, a superfície hidrofílica Acqua, associada ao losartan (SHRL ACQ), ofereceu um maior e melhor torque de remoção dos implantes quando comparada a todos os subgrupos, corroborando com achados onde ratos espontaneamente hipertensos tratados com losartan obtiveram melhores resultados quando comparados aos grupos hipertenso e controle.⁹ Ainda, outro estudo demonstra que aos 15 dias pós-operatórios, a superfície hidrofílica propiciou uma melhor biomecânica em tíbias de ratos enxertadas com material sintético (BoneCeramic - Straumann®), em detrimento da mesma área enxertada, com o mesmo material, mas com instalação de implantes de superfície usinada.¹⁸ Em contrapartida, um outro estudo utilizando das mesmas superfícies, mas com instalação de implantes em tíbias de coelhos, verificou que não houve diferença do torque de remoção aos 14 e 28 dias pós-operatórios.²⁷

Através dos dados obtidos pela análise por microtomografia computadorizada, não foram observadas grandes diferenças entre os tratamentos de superfície dos implantes, mostrando que os dois tipos de texturizações apresentam respostas semelhantes quanto às características microarquiteturais do tecido ósseo reparacional aos 60 dias pós-operatórios. Estudos com o mesmo modelo experimental demonstram uma qualidade inferior do tecido ósseo neoformado na região de contato osso-implante em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), bem como os efeitos positivos do losartan sobre essa região quando estes animais foram tratados.^{9,10} Quanto ao anti-hipertensivo administrado, observa-se a melhora de alguns parâmetros para o grupo controle losartan (COL NEO e COL ACQ), confirmando o efeito favorável da sua ação vasodilatadora sobre o processo de reparo peri-implantar.^{19,20}

Na análise dos resultados, a superfície Acqua parece reverter o desequilíbrio no processo da dinâmica óssea que ocorre em animais hipertensos, dado que sua associação ao losartan promove uma melhor taxa de aposição mineral diária (MAR), quando comparado ao

grupo hipertenso não tratado (SHRL ACQ x SHR ACQ), assim como num estudo citado anteriormente, que concluiu que o turnover do osso alveolar em animais hipertensos tratados com losartan possui melhores valores de MAR quando comparados a animais hipertensos sem tratamento.¹⁰ Por outro lado, com os dados obtidos da MAR, verifica-se também que a melhor precipitação de íons minerais (cálcio e fósforo) para a superfície Acqua são independentes do fármaco nos subgrupos controles (COA ACQ e COL ACQ), sugerindo que este tratamento de superfície possa atuar em fases pós-operatórias iniciais da mineralização óssea. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significantes para a superfície ativa de mineralização, que expressa a quantificação de osso novo. Este resultado parece controverso, porém, pode ser explicado devido ao período estudado, onde a osseointegração se mostra completa. Entretanto, com os dados obtidos pela análise microtomográfica deste estudo, para o parâmetro “volume ósseo (BV/TV)”, os subgrupos COA ACQ e COL ACQ apresentaram maiores valores absolutos, quando comparados aos demais subgrupos, com exceção de COL NEO, corroborando com os achados para a MAR.

No presente estudo, o período de avaliação da estabilidade dos implantes foi de 60 dias, onde ambas as superfícies viabilizaram a osseointegração destes. A influência do losartan torna-se evidente, uma vez que a qualidade da neoformação óssea possa ser compensada na espessura trabecular de SHRs tratados, a fim de se comparar a qualidade óssea dos controles. Para o subgrupo hipertenso tratado com instalação dos implantes Acqua (SHRL ACQ), houve uma significativa taxa de aposição mineral diária e estabilidade óssea peri-implantar da região, sugerindo-se que haja alterações de sinalização para a osseointegração em períodos iniciais da remodelação óssea; também, os subgrupos COA ACQ e COL ACQ evidenciaram através da MAR que, a superfície Acqua, independentemente do fármaco, possa promover alterações nas etapas iniciais do turnover ósseo, o que oportunizaria uma possível aplicação de cargas imediatas após a instalação de implantes com esta superfície, devido à otimização do início da osseointegração, indicando que a molhabilidade e hidrofiliabilidade desta superfície possa favorecer o reparo ósseo, independentemente do fármaco, como demonstrado em estudos com ratos, coelhos, cachorros e ovinos.^{15, 17, 18, 27, 28}

6. Conclusão

Desta forma, os dois tipos de texturizações apresentaram respostas semelhantes quanto às características microarquiteturais do tecido ósseo peri-implantar, ainda que, considerando as limitações deste estudo, bem como nas diferentes condições sistêmicas avaliadas, a superfície Acqua pareça melhorar as etapas iniciais da osseointegração.

Referências

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365(9455):217-23. doi: 10.1016/s0140-6736(05)17741-1.
2. Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol*. 1982; 243(3):365-0. doi.org/10.1152/ajpheart.1982.243.3.H365.
3. McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension. AHA Journals*. 1981;3(3):162-7. doi: 10.1161/01.HYP.3.3_Pt_2.1162.
4. Whitebread S, Male M, Kamber B. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *BIOCHEM BIOPH RES CO*. 1989; 163(1):284-91. doi: 10.1016/0006-291x(89)92133-5.
5. Baris OB, Ozdemir S, Sarikanat M, Yaras N, Koc P, Demir N, Karayalcin B, Oguz N. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs. *Pharmacol Reports*. 2012; 64(4): 878–888. doi:10.1016/S1734-1140(12)70882-4.
6. Yamamoto S, Kido R, Onishi Y, Fukuma S, Akizawa T, Fukagawa M, et al. Use of Renin-Angiotensin System Inhibitors Is Associated with Reduction of Fracture Risk in Hemodialysis Patients. *PLoS ONE*. 2015; 10(4): e0122691. doi:10.1371/journal.pone.0122691.
7. See S. Angiotensin II receptor blockers for the treatment of hypertension. *EXPERT OPIN PHARMACO*. 2001; 2(11): 1795-804. doi: 10.1517/14656566.2.11.1795.
8. Al-Majed AR, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartan: Comprehensive Profile. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2015; 40:159-94. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.02.003.
9. Mulinari Dos Santos G, de Souza Batista FR, Kirchweiger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res*. 2018; 29(11):1126-34. doi: 10.1111/clr.13376.
10. Mulinari-Santos G, Santos JSD, Palin LP, Silva ACED, Antoniali C, Faverani LP, Okamoto R. Losartan improves alveolar bone dynamics in normotensive rats but not in hypertensive rats. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27:e20180574. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0574.

11. Moura AP, Montalvany-Antonucci CC, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, Bigueti CC, Garlet GP, et al. Effects of angiotensin II type I receptor blocker losartan on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2016; 149:358-65. doi: 10.1016/j.ajodo.2015.09.019.
12. Santos CF, Morandini AC, Dionisio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One.* 2015; 10:e0134601. doi: 10.1371/journal.pone.0134601.
13. Queiroz-Junior CM, Silveira KD, Oliveira CR, Moura AP, Madeira MF, Soriani FM, et al. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. *J Periodontal Res.* 2015; 50:814-23. doi: 10.1111/jre.12269.
14. Cooper LF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *J Prost Dent.* 1998; 80:439–449. doi: 10.1016/s0022-3913(98)70009-5.
15. Val JE, Gómez-Moreno G, Ruiz-Linares M, Prados-Frutos JC, Gehrke SA, Calvo-Guirado JL. Effects of Surface Treatment Modification and Implant Design in Implants Placed Crestal and Subcrestally Applying Delayed Loading Protocol. *J Craniofac Surg.* 2017; 28(2):552-558. doi: 10.1097/SCS.
16. Buser, D, Broggini, N, Wieland, M, Schenk, R. K, Denzer, A. J, Cochran, D. I, Steinemann, S. G. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Den Res.* 2004; 83(7), 529–533. doi:10.1177/154405910408300704.
17. Sartoretto SC, Calasans-Maia JA, Costa YOD, Louro RS, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Accelerated Healing Period with Hydrophilic Implant Placed in Sheep Tibia. *Braz Dent J.* 2017; 28(5):559-565. doi: 10.1590/0103-6440201601559.
18. Pinotti FE, de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr. Analysis of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in grafted areas: A Preclinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(10):963-972. doi:10.1111/clr.13361.
19. Gealh WC, Pereira CC, Luvizuto ER, Garcia-Júnior IR, Antoniali C, Okamoto R. Healing process of autogenous bone graft in spontaneously hypertensive rats treated with losartan: an immunohistochemical and histomorphometric study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72:2569-81. doi: 10.1016/j.joms.2014.07.010.
20. Manrique, N., Pereira, C. C., Luvizuto, E. R., Sanchez Mdel, P., Okamoto, T., Okamoto, R., ... Antoniali, C. Hypertension modifies opg, rank, and rankl expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015; 19:1319–27. doi:10.1007/s00784-014-1369-0.

21. Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, Freire A, Faverani LP, Sumida DH, Okamoto R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *J Appl Oral Sci.* 2018; 10;26:e20170470. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0470.
22. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
23. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig.* 2017;21(5):1485-94. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.
24. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44:798-805. doi: 10.1016/j.ijom.2015.02.018.
25. Faverani, L. P., Polo, T. O., Ramalho-Ferreira, G., Momesso, G. A., Hassumi, J. S., Rossi, A. C., ... Okamoto, R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2017; 22, 255–265. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2.
26. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto RI Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015; 20:038003. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.038003.
27. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015; 26(5):451-7. doi: 10.1590/0103-6440201300411.
28. Trento GDS, Spin-Neto R, Bassi APF, Okamoto R, Gabrielli MAC, Pereira-Filho VA. Bone tissue formation around two titanium implant surfaces placed in bone defects filled with bone substitute material or blood clot: A pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019; 21(6):1175-80. doi: 10.1111/cid.12855.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



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 **"Reparo ósseo peri-implantar em tíbias de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com losartan: Análise biomecânica, molecular, microtomográfica, dinâmica óssea por fluorocromos, imunohistoquímica e histológica"**, Processo FOA nº 00404-2016, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Junho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Julho de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Agosto de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Peri-implant bone healing in the of spontaneously rats (SHR) treated with losartan: A biomechanical, molecular, microtomography, bone dynamics by fluorochromes, immunohistochemical and histological analysis"**, Protocol FOA nº 00404-2016, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 14, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 07, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 07, 2019.

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