



LARISSA GABRIELE CAMPOS

**Avaliação da adição de nanopartículas de hidroxiapatita
à implantes tratados com jateamento de zircônia e duplo
ataque ácido no reparo ósseo periimplantar de ratas
ovariectomizadas**

**Araçatuba
2023**

LARISSA GABRIELE CAMPOS

**Avaliação da adição de nanopartículas de hidroxiapatita
à implantes tratados com jateamento de zircônia e duplo
ataque ácido no reparo ósseo periimplantar de ratas
ovariectomizadas**

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.

Orientador: Prof. Assoc. Leonardo Perez
Faverani

Araçatuba

2023

Dedico o presente trabalho primeiramente à Deus que iluminou meus passos e pensamentos, aos meus pais, Jaco e Patricia , por acreditarem em mim e fazerem possível esse sonho, minha formação. À todas as pessoas com as quais compartilhei essa caminhada sendo suporte e acalento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

À Deus pelo dom da vida, por fortalecer meu coração e me abençoar com saúde, fé, constância, amor e empatia. Por me guiar e iluminar a cada passo, á você imensa gratidão.

Ao meu pai Jaco que é meu exemplo de vida, por nunca medir esforços para que esse sonho se tornasse realidade, obrigada por acreditar em mim, por me incentivar a ir em busca dos meus sonhos e por nunca me desamparar mesmo nos nossos momentos mais difíceis. Sempre sendo apoio e alicerce para minhas realizações, sem você nada disso seria possível.

À minha mãe Patricia pelo apoio mesmo com o sofrimento pela minha ausência, por todo carinho, dedicação e amor e por não medir esforços para sempre me ver bem e feliz.

Ao meu namorado Mauricio, por todo amor, carinho e compreensão, pelo incentivo e apoio durante todos esses anos.

À todos professores Da Faculdade de odontologia de Araçatuba por dedicarem à docência. Em especial meu orientador o Professor Leonardo Perez Faverani que me acolheu no grupo de estudo e ensinou não só sobre a vida acadêmica , mas sobre humildade, generosidade,paciência, amor e como ser uma pessoa melhor. Uma grande inspiração não só para mim mas para todos meus colegas de turma.Que Deus continue abençoando sua trajetória.

À Professora Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, exemplo de cuidado, carinho e amor, grande professora a qual admiro e me inspiro.

Ao meu grupo de pesquisa do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial Stefanny Barbosa por toda atenção , paciência e dedicação.

Aos meus amigos que são família Camila, Beatriz, Barbara,Ana, Gabriele, Guilherme, Janaina , vocês tornaram meus dias mais felizes e coloridos deixando essa jornada mais

leve.

Aos demais amigos que fizeram a jornada acadêmica ser imensamente prazerosa , em especial, Agda, Karen, Cauane , Mabily, Natalia, Kezia, Leticia , Ruan, Gabriela, Juliana.

“Dizem que a vida é pra quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é pra quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender....”

Clarice Lispector

CAMPOS, L. G. **Avaliação da adição de nanopartículas de hidroxiapatita a implantes tratados com jateamento de zircônia e duplo ataque ácido no reparo ósseo peri-implantar de ratas ovariectomizadas.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

RESUMO

Os implantes médicos- odontológicos constituídos por titânio (Ticp) são constantemente modificados, em especial, a sua topografia, para a obtenção de melhores propriedades físico-químicas e biológicas dos tecidos periimplantares. Assim, o maior desafio atual é desenvolver uma topografia para melhorar a reparação óssea em áreas críticas no que se refere à estabilidade dos tecidos peri-implantar, representadas principalmente por ossos de menor densidade. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi analisar os parâmetros estruturais, imunoistoquímicos e reparacionais por meio de um método de jateamento de zircônia e ataque ácido com adição nanopartículas de hidroxiapatita (grupo ZrHa) em ossos de baixa densidade. Para isso, inicialmente realizou-se uma caracterização estrutural da superfície de discos tratados por meio da superfície ZrHa, e também da superfície Zr, ou seja, jateamento de zircônia e ataque ácido de acordo com padrões comerciais, através das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria, energia livre de superfície e análise de microdureza. Para o estudo *in vivo* foram utilizadas 22 ratas Wistar, as quais foram submetidas a ovariectomia bilateral e após 90 dias, realizou-se instalação de implantes de ambas as superfícies utilizadas neste estudo. Para avaliar os efeitos das texturizações no reparo periimplantar realizou-se as análises de histologia e imunistoquímica aos 14 e 28 dias pós-operatório, contra-torque aos 28 dias e histometria aos 60. Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análise estatística com nível de significância de 0,05. Os resultados da caracterização da superfície demonstraram que o grupo ZrHa promoveu alteração na morfologia superficial, com formação de poros distribuídos homogeneamente. Os resultados de energia livre de superfície, microdureza e rugosidade foram semelhantes entre os grupos. Em relação ao reparo periimplantar, foi observado maior contra-torque para ZrHa ($p=0,030$) e tendência a apresentar maior AON e ELCOI do que o grupo Zr ($p<0,05$). A análise histológica qualitativa constatou melhor maturação óssea para o grupo ZrHa aos 14 e 28 dias e perfil inflamatório satisfatório para ambos os grupos. Os resultados obtidos nesse estudo foram bastante favoráveis e promissores, estimulando a realização de mais estudos para futura aplicação clínica da texturização proposta.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Osseointegração. Hidroxiapatita.

CAMPOS, L. G. **Influence of experimental texturing involving zirconium blasting and double acid etching on peri-implant bone repair in rats with induced osteoporosis**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

ABSTRACT

Influence of experimental texturing involving zirconium blasting and double acid etching on peri-implant bone repair in rats with induced osteoporosis. The medical-dental implants consisting of titanium (ICT) are constantly modified, especially their topography, to obtain better physicochemical and biological properties of periimplant tissues. Thus, the greatest current challenge is to develop a topography to improve bone repair in critical areas with regard to the stability of peri-implant tissues, mainly represented by lower density bones. In this context, the aim of this study was to analyze the structural, immunohistochemical and reparative parameters by means of a zirconia sandblasting and acid etching method with addition of hydroxyapatite nanoparticles (ZrHa group) in low density bones. For this, 22 Wistar rats were used, which underwent bilateral ovariectomy and after 90 days, implants were installed on both surfaces used in this study. To evaluate the effects of texturization on peri-implant repair, histology and immunohistochemistry analyzes were performed at 14 and 28 days after surgery, counter-torque at 28 days and histometry at 60 days. All quantitative data obtained were submitted to statistical analysis with level of significance of 0.05. The results related to peri-implant repair showed greater counter-torque for ZrHa ($p=0.030$) and a tendency to present greater AON and ELCOI than the Zr group ($p<0,05$). Qualitative histological analysis showed better bone maturation for the ZrHa group at 14 and 28 days and a satisfactory inflammatory profile for both groups. The results obtained in this study were very favorable and promising, encouraging further studies for future clinical application of the proposed texturing.

Keywords: Bone regeneration; Osseointegration; Hydroxyapatite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspecto final dos espécimes. Da esquerda para a direita: grupo ZrHa e grupo Zr.....	22
Figura 2 -	Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E).....	25
Figura 3-	Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (a) Tricotomia na região de ambas as metáfises tibiais. (b) Antissepsia das regiões com PVPI. (c) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial, seguida da divulsão dos planos; (d) Fresagem com lança fresa de 1,4 mm montada em motor convencional; (e) Preparo na metáfise tibial realizado; (f) Instalação dos implantes com rosqueamento digital; (g) reposicionamento dos tecidos; (h) Sutura por planos anatômicos.....	26
Figura 4 -	Imagens representativas de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para o cálculo dos parâmetros histométricos: ECLOI e AON. (A) setas vermelhas indicam o perímetro de osso localizado na interface osso/implante, corado pelo vermelho de alizarina; (B) a seta vermelha indica o cálculo de área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante.....	28
Figura 5 -	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (magnitude de 1000x e 2000x) da superfície dos discos de Ticp para os grupos Zr e ZrHa.....	32
Figura 6 -	Representação gráfica da média da rugosidade Ra da liga Ticp em função das modificações de superfície em ambos os grupos experimentais.....	33
Figura 7 -	Representação gráfica da média da energia livre de superfície em relação ao ângulo de contato para água e diiodometano da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos Zr e ZrHa.....	34
Figura 8 –	Representação gráfica da média da microdureza de Vickers da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos Zr e ZrHa.....	34
Figura 9 -	Imagens representativas do tecido ósseo periimplantar observado por meio da análise histométrica.....	35
Figura 10 –	Representação gráfica da análise de Área de osso neoformado demonstrando superioridade para o grupo Teste ($p=0,178$).....	36

Figura 11 -	Representação gráfica da análise de Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) para os grupos experimentais ($p=0,691$)....	36
Figura 12 –	Representação gráfica da análise biomecânica de contra-torque realizada por meio de torquímetro digital, evidenciando maior torque para o grupo teste para rompimento da interface formada entre tecido ósseo e implante.....	37
Figura 13 -	Fotomicrografias em objetiva de 20x para representação das características do tecido ósseo periimplantar para ambos os grupos (Zr e ZrHa) aos 14 e 28 dias pós-operatório.....	38
Figura 14 –	Fotomicrografias em objetiva de 100x para representação da maturação do tecido ósseo da espira mais central de cada grupo experimental (Zr e ZrHa) aos 14 e 28 dias pós-operatório, evidenciando maturação mais avançada para grupo ZrHa.....	39
Figura 15 –	Representação gráfica referente a contagem de células inflamatórias em região periimplantar.....	40
Figura 16 –	Representação gráfica referente a contagem de vasos sanguíneos em região periimplantar.....	40
Figura 17 –	Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcação para Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para ambos os grupos experimentais, no período de 14 dias.....	41
Figura 18 –	Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcação para Osteocalcina (OCN) para ambos os grupos experimentais, no período de 28 dias.....	41

LISTA DE SIGLAS

AON	Área de osso neoformado
ELCOI	Extensão linear de contato osso/implante
HA	Hidroxiapatita
OCN	Imuno marcação para osteocalcina
Ti	Titânio
TPS	Plasma spray de titânio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Texturização de superfície por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita	20
3.2 Caracterização estrutural	22
3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
3.2.2 Perfilometria – análise da rugosidade de superfície	23
3.2.3 Energia livre de superfície.....	23
3.2.4 Análise de microdureza.....	23
3.3 Animais: desenho experimental de indução da osteoporose.....	24
3.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias.....	25
3.5 Método de análise do reparo periimplantar.....	27
3.5.1 Histometria.....	27
3.5.2 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque).....	28
3.5.3 Análise histológica.....	28
3.5.4 Imunoistoquímica.....	29
3.6 Método de análise dos resultados.....	29
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Caracterização estrutural.....	32
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
4.1.2 Perfilometria – análise de rugosidade de superfície.....	33
4.1.3 Energia livre de superfície.....	33
4.1.4 Análise de microdureza.....	34
4.2 Histometria.....	35
4.3 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque).....	36
4.4 Análise histológica.....	37
4.5 Imunoistoquímica.....	40
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS.....	53

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

No contexto da implantodontia, a utilização do Titânio (Ti) tem sido amplamente investigada pela literatura, sendo que, atualmente mais de 98% dos implantes osseointegráveis são constituídos de Ti, especialmente o Ti grau IV (ASTM F67), onde a incorporação de elementos como Sílica e Ferro, restantes durante o processo de fundição, forjamento ou laminação, aumentam a resistência mecânica do material (STEINEMANN, 2000).

Além da resistência mecânica, é importante se pensar nas interações biológicas necessárias para a garantia do sucesso a longo prazo das reabilitações implantossuportadas. Nesse sentido, é de grande importância alcançar e manter a osseointegração e a integração epitelial estável. A osseointegração garante um rígido suporte para a restauração protética, conferindo a adequada transferência de forças ao osso adjacente durante a função mastigatória (Wälivaara et al., 1994). Já a integração epitelial do tecido mucoperiimplantar consiste no estabelecimento de uma área de barreira epitelial, que atua protegendo o tecido ósseo subjacente e impede a penetração de microorganismos (CHAI *et al.*, 2020).

Durante os 50 anos dos princípios da osseointegração, a indústria biomédica desenvolveu modificações contínuas na busca por implantes com propriedades estruturais e biológicas satisfatórias, na expectativa de alcançar uma maior estabilidade, adequada muointegração e consequentemente maior longevidade dos tratamentos reabilitadores. Os trabalhos relacionados aos processos de texturização de superfície dos implantes dentários buscam desenvolver meios que sejam capazes de atuar no aumento da resistência mecânica, à corrosão, bem como favorecer as respostas biológicas da osseointegração, pela maior área de superfície de contato, atraindo de forma mais eficaz e mais rapidamente células da linhagem osteoblástica, em especial em regiões de menor densidade do tecido ósseo (DE BRUYN *et al.*, 2000).

Diversas modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes dentários foram desenvolvidas (IVANOFF *et al.*, 2001; WENNERBERG, ALBREKTSSON, 2009), em que se destacam principalmente as técnicas de adição, as quais promovem uma superfície do implante com saliências (recobertas por plasma spray de titânio - TPS e de hidroxiapatita - HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio e deposição de íons) (HATAMLEH *et al.* 2018) ou técnicas de subtração por meio da criação de poros na superfície do implante (eletropolimento, polimento mecânico, tratamentos com ácidos, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio – TiO₂ ou óxido de alumínio – Al₂O₃, oxidação e irradiação com laser (THORMANN *et al.*, 2014).

Estudos comparando os implantes dentários de superfície usinada com superfície rugosa mostraram superioridade dos resultados de reparo ósseo nos implantes com superfície modificada (QUEIROZ *et al.*, 2013). Os fatores que influenciam na melhor e mais rápida osteogênese para estas superfícies estão relacionados à melhor retenção do coágulo sanguíneo, aumento da migração, proliferação celular e aumento da área de contato da superfície do implante (WENNERBERG, ALBREKTSSON, 2009).

Uma preocupação diante desta gama de opções de texturização é reunir características favoráveis tanto nos aspectos microestruturais como nos aspectos biológicos reparacionais (TAVARES *et al.*, 2007). A incorporação de elementos que são precipitados na matriz do tecido ósseo, tal como o cálcio, fósforo ou hidroxiapatita é uma técnica bastante interessante no processo de texturização por adição, a qual tem demonstrado maior afinidade com as células fundamentais de formação de osso (QUEIROZ *et al.*, 2013).

Para que ocorra o fenômeno da osseointegração, um fator essencial é a qualidade do tecido ósseo, uma vez que durante toda a vida o complexo implante/tecido ósseo periimplantar será submetido às constantes oscilações térmicas, químicas e mecânicas, as quais induziram a um processo de remodelação acoplada. Deste modo, o tecido ósseo não é estático e para que desempenhe suas funções de suporte e homeostase mineral de forma saudável, é necessário um processo de remodelação contínua (LERNER, 2006). Este processo dinâmico envolve a reabsorção, formação e mineralização óssea de forma coordenada. Quando há algum fator que possa alterar o balanceamento deste catabolismo e anabolismo, a qualidade do tecido esquelético pode ser severamente comprometida, resultando no desenvolvimento de uma condição patológica (RENDINA, 2013).

Dentre as alterações do metabolismo ósseo que podem comprometer a taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis, destacamos a osteoporose (HURST, 2014). Esta alteração esquelética sistêmica, é caracterizada pela perda óssea progressiva, ocasionada devido ao processo de desequilíbrio da atividade de remodelação óssea, causando deterioração da microarquitetura óssea, com diminuição expressiva da densidade óssea, com formação de trabéculas ósseas mais finas e por vezes com menor atividade angiogênica. Esta desordem do metabolismo ósseo é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa, e por mais que não contra-indique a realização de tratamento reabilitador, reduz de forma expressiva a taxa de sobrevivência dos implantes (RAPAPORT, 2012).

Diante disso, torna-se necessário a realização de estudos que busquem a otimização do processo de reparo ósseo ao redor de implantes osseointegráveis. Um bom

modelo experimental animal para isso é a instalação de implantes na metáfise tibial de ratos, visto que a microarquitetura óssea deste osso longo é a que mais se assemelha ao osso alveolar humano, mimetizando as interações teciduais a serem analisadas (FAVERANI *et al.*, 2014). Atrelado a instalação de implantes, os ossos de menor densidade, caracterizados pela osteoporose experimental, categorizam-se como um modelo interessante tanto para a verificação da influência dos métodos de texturização de superfície dos implantes, bem como para o comportamento biológico da osseointegração.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo objetivou analisar a influência de um método de jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita nos parâmetros estruturais, imunoistoquímicos e reparacionais do tecido ósseo.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a presente pesquisa, foi realizada inicialmente uma caracterização estrutural da superfície de discos tratados pela texturização por um método de jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo ZrHa) e também dos discos com tratamento por jateamento de zircônia e ataque ácido (grupo Zr), conforme fornecimento comercial, no período baseline, por meio das análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Perfilometria, Energia livre de superfície e análise de microdureza. Em segundo momento, como proposta da avaliação do reparo ósseo periimplantar *in vivo*, foi realizada cirurgia de ovariectomia bilateral em todas as ratas para indução de osteoporose e após 90 dias desta, realizada cirurgia para instalação dos implantes do grupo ZrHa e do grupo Zr em tíbia, de forma randomizada. Como métodos de análise realizou-se histometria, análise biomecânica de contra-torque, análise histológica e imunoistoquímica. Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análise estatística.

3.1 Texturização de superfície por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita

Para a caracterização estrutural da superfície desenvolvida e avaliação da sua influência no reparo periimplantar, 20 discos e 22 implantes de Ticp grau 4 (99,7 Ti; 0,16 O₂; 0,004 N₂; 0,006 C; 0,0019 H₂ e 0,12 Fe em % de peso), de 2mm de diâmetro e 4,5mm de comprimento (26) fornecidos pela empresa DSP Biomedical (Campo Largo- Pr) foram utilizados.

Os discos foram polidos e limpos através de métodos padronizados de metalografia por meio de lixas sequenciais (#320, #400, #600, #800). A rugosidade de superfície de todos os discos foi determinada a fim de proporcionar uma padronização no acabamento dos discos de Ticp. Os discos foram limpos em cuba ultrassônica com água deionizada (10 minutos) e propanol a 70% (10 minutos) e finalmente secos por meio de jatos de ar quente a 250°C (15,26,30).

A partir deste momento, discos e implantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo 10 discos e 11 implantes destinados para o processo de texturização com jateamento de zircônia e ataque ácido de acordo com os padrões estabelecidos pela empresa do setor de implantodontia, enquanto os 10 discos e 11 implantes restantes

foram destinados para o método de texturização de superfície com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (Figura 1).

A texturização foi iniciada pelo jateamento de partículas de zircônia produzindo uma microtexturização superficial por subtração. Para isso, a superfície foi bombardeada por partículas de zircônia de 70 μm a uma distância de 5 cm do bico do revólver de jateamento por 20 segundos com pressão de 6 Bar criando superfícies com ranhuras irregulares por meio da abrasão.

A segunda etapa da texturização após o jateamento foi o ataque ácido das superfícies caracterizando o processo de subtração por ácido. Os elementos foram condicionados em tubo de ensaio Becker em soluções de ácido hidrófluorídrico (HF) e ácido nítrico (HNO_3) com quantidade suficiente para cobrir as peças que permaneceram no banho por 40 minutos. O conteúdo do recipiente foi homogeneizado com bastão de vidro a cada 5 minutos. Ao final destes 40 minutos do processo descrito o ácido foi substituído e a metodologia foi repetida seguindo os mesmos parâmetros. Após esse período o ácido foi removido e, no mesmo recipiente os implantes foram banhados por água destilada por 4 vezes. Os implantes foram depositados em tubo de ensaio de Becker, preenchidos com água destilada, e levados à cuba ultrassônica (Setecsom - Mairiporã, São Paulo - Brasil) por 40 minutos e foi efetuada a troca da água destilada a cada 10 minutos. Após a remoção dos discos e implantes da cuba ultrassônica, os mesmos receberam banho de vapor na caldeira C 5 (CR - Curitiba, Paraná- Brasil). Os implantes foram secos na estufa (Odontobrás- Ribeirão Preto, São Paulo- Brasil) por 5 horas a 100°C.

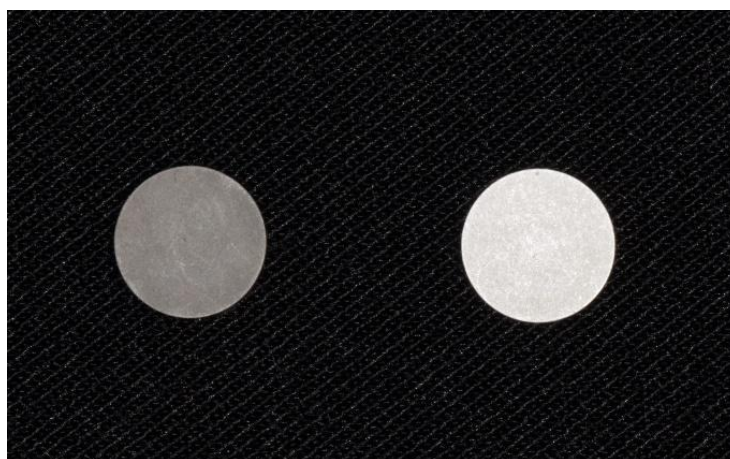
Para a adição de nanopartículas de hidroxiapatita nos discos e implantes do grupo ZrHa, seguiu-se o processamento biomimético. O processo teve o tratamento alcalino dos discos e implantes com solução aquosa de NaOH 1M em autoclave vertical (Fanem - São Paulo, São Paulo- Brasil) à 130°C por 60 minutos, depois secos em temperatura ambiente. O tratamento térmico dos discos e implantes foi executado em forno tubular (EDG - São Carlos, São Paulo- Brasil) a 200°C por 1 hora com aquecimento de 10°C/min. Os discos e implantes foram imersos em 5 mL de fluido corpóreo simulado modificado (FCSm), a 37°C trocado a cada 2 dias, retirados após um período de 14 dias. Após a retirada da solução, os implantes foram mantidos em dessecador para evitar contaminação e lavados com água destilada.

A preparação da solução (FCSm) foi realizada com a lavagem de todo material utilizado com água destilada. Posteriormente, a solução de HCl 1M foi usada na lavagem e o material enxaguado cinco vezes com água deionizada pura. A secagem do material em estufa foi por dissolução dos reagentes em recipiente de boca larga e usando agitação moderada. Um terço de água deionizada pré-aquecida a 37°C em estufa foi

colocada no frasco para dissolução. Os reagentes foram pesados em balança analítica e transferidos ao frasco um a um de acordo com a composição e massa do FCS modificado por Andrade et al. 2002. A solução então foi agitada por 10 a 15 minutos para homogeneização. O ajuste de pH foi feito transferindo a solução à 37°C para um béquer sob agitação moderada e adicionado água pré-aquecida até o volume da solução ser de pelo menos três quartos do volume final. O pH da solução ficou na faixa de 7,5 – 8,0 sendo controlado com a adição de sulfato de cálcio. A aferição do volume final foi feita após a solução ter sido colocada num balão volumétrico. O volume final de um litro foi completado com água deionizada.

Após a aferição, o balão foi tampado e a solução homogeneizada agitando-a por quarenta vezes. A armazenagem da solução foi em frasco de polietileno previamente limpo que permaneceu em geladeira.

FIGURA 1 - Aspecto final dos espécimes. Da esquerda para a direita: grupo ZrHa e grupo Zr



Fonte: Autor, 2023

3.2 Caracterização estrutural

3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização da superfície dos discos de Ticp. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento (RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

3.2.2 Perfilometria – análise da rugosidade de superfície

A rugosidade de superfície (Ra - média aritmética) foi mensurada por meio de

um perfilômetro com deslocamento (cut-off) de 500 μm em tempo constante de 12 segundos. Três mensurações foram obtidas para cada disco de Ticp e a média calculada (FAVERANI *et al.*, 2014).

3.2.3 Energia livre de superfície

A análise da energia livre de superfície foi mensurada de acordo com o protocolo sugerido por (COMBE *et al.*, 2004) e foi obtida com auxílio de um goniômetro (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). Os discos foram lavados com detergente líquido neutro e enxaguados com água deionizada até a completa remoção de qualquer traço de detergente. Foram submetidos a dois banhos ultrassônicos, o primeiro com uma solução de metanol e água destilada (1:1) por 10 minutos e o segundo com água destilada por 10 minutos, e então deixados para secar naturalmente.

Para determinação da energia livre de superfície, foi mensurado o ângulo de contato formado entre a superfície do disco e uma gota séssil de cinco líquidos teste, Diiodometano, e água destilada. Esta mensuração foi realizada em três gotas de cada líquido em ambiente com temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade controlada.

Cada gota séssil (15 μL) foi depositada na superfície do disco por meio de um dispensador automático acoplado ao goniômetro. A imagem obtida foi capturada imediatamente pelo aparelho e os ângulos de contato formados pelos líquidos na superfície do substrato foram mensurados automaticamente por meio do software Ramé-hart DROPimage Standard (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). O software do equipamento fez os cálculos e forneceu os valores do componente polar e apolar, bem como da energia livre de superfície (COMBE *et al.*, 2004).

3.2.4 Análise de microdureza

Foi realizada a microdureza dos discos, no período baseline, por meio de um microdurômetro (Shimadzu HMV-2000 Micro Hardness Tester; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Esse teste foi realizado em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Quatro mensurações em áreas distintas foram realizadas em cada espécime, carga aplicada de 500 kgF por 15 segundos e o valor médio foi calculado. A microdureza está expressa em unidade de dureza de Vicker (VHN). Os valores de microdureza foram calculados usando a seguinte fórmula: $\text{VHN} = 2P \sin(136^\circ / 2) / d^2$, na qual P = carga aplicada e d = comprimento das endentações de diagonais.

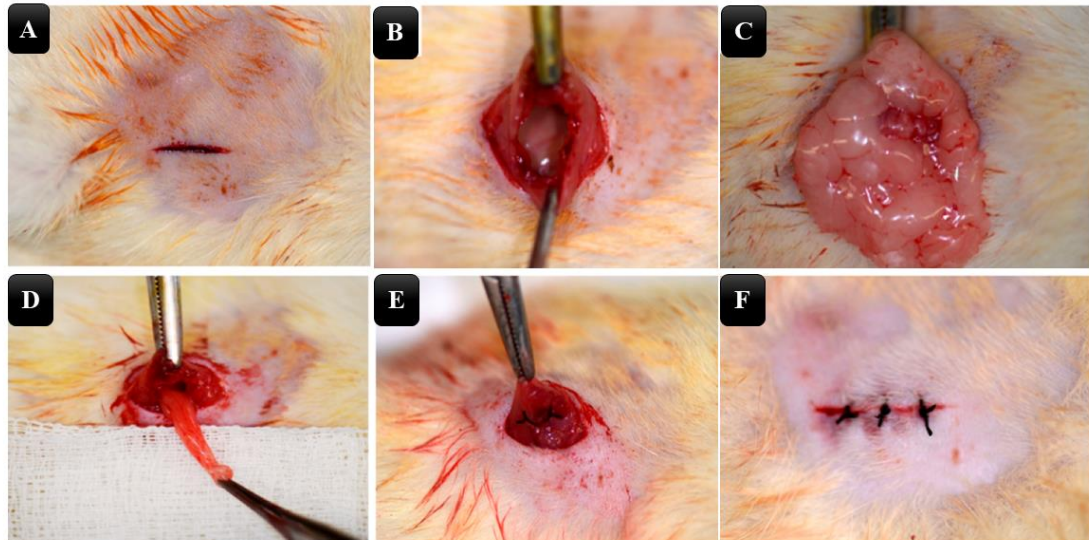
3.3 Animais: Desenho experimental de indução da osteoporose

Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tanto, foi obtido o parecer favorável do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo: 00528-2018).

Foram utilizadas 22 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas (n=11 tíbias por grupo experimental), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos. Para a definição do número da amostra, inicialmente foi realizado o cálculo do poder do Teste (“Power Test”) no website: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html, em que para a obtenção de um poder de 0,8, com nível de significância de 5%, diante dos grupos amostrais, o número mínimo de amostras sugerido por grupo foi de 11.

Após esta fase da pesquisa, todas as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Para tanto, foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de ketamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, sendo posteriormente realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, foram localizados os ovários e os chifres uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos), seguida da remoção dos ovários. Por fim, foi realizada sutura por planos com fio não absorvível.) (Figura 2).

FIGURA 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E)



Fonte: Autor, 2023.

Após o procedimento cirúrgico, estes animais continuaram no biotério sendo alimentados com ração e água *ad libitum* durante todo o tempo experimental.

3.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias

Após 90 dias da cirurgia de ovariectomia para indução da osteoporose, todos os animais passaram por jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico para instalação dos implantes em tíbia. Em seguida, foram sedadas pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

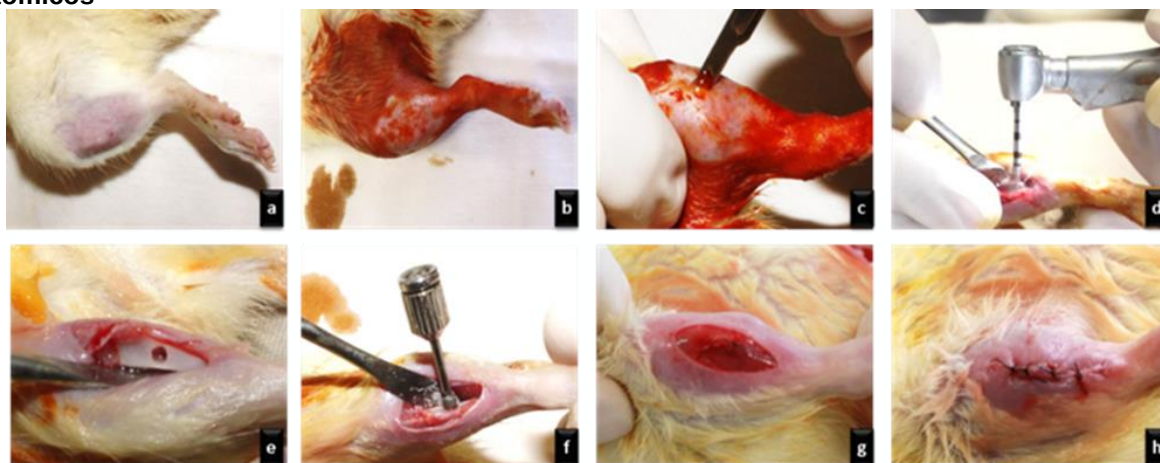
Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região incisa com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes. Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau

IV com superfície texturizada por ataque ácido e jateamento de zircônia de acordo com os parâmetros da empresa do Setor que forneceu os implantes, ou implantes com jateamento de zircônia e ataque ácido com adição nanopartículas de hidroxiapatita. As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2 mm e altura de 4,5 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0mm, com travamento e estabilidade inicial (Figura 3).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Portanto, cada animal recebeu os dois implantes que foram testados nesta pesquisa: com texturização controle e com texturização por jateamento de zircônia e ataque ácido com adição nanopartículas de hidroxiapatita. A escolha das tíbias para a instalação de implantes do grupo controle ou teste foi feita de forma aleatória, por meio do website: www.randomization.com.

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

FIGURA 3 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (a) Tricotomia na região de ambas as metáfises tibiais. (b) Antissepsia das regiões com PVPI. (c) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial, seguida de divulsão dos planos; (d) Fresagem com fresa lança de 1,4 mm montada em motor convencional; (e) Preparo na metáfise tibial realizado; (f) Instalação dos implantes com rosqueamento digital; (g) reposicionamento dos tecidos; (h) Sutura por planos anatômicos



Fonte: Autor, 2023.

3.5 Métodos de análise do reparo ósseo periimplantar

As eutanásias ocorreram nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios para animais destinados à análises de tecidos descalcificados e aos 60 dias para os animais destinados à análises de tecidos calcificados, sendo realizada por sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 100mg/kg) pela via intramuscular.

Análises para tecidos calcificados

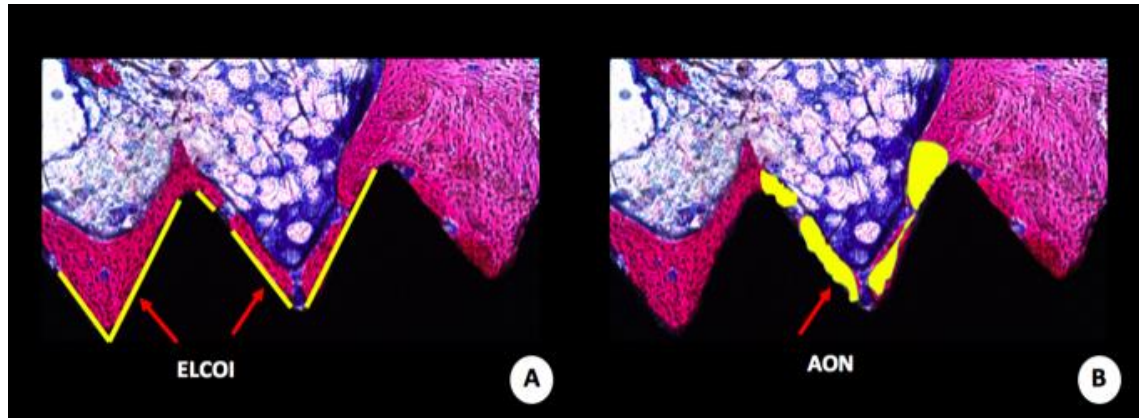
3.5.1 Histometria

Para a análise histométrica, 6 animais foram submetidos à eutanásia 60 dias após a instalação dos implantes (reparo ósseo periimplantar). Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100% e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que fosse utilizada apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e em seguida passaram pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80 µm de espessura.

As lâminas obtidas foram então lavadas em água deionizada e foram coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Histometricamente, foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) bilateralmente e da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante. Como cada implante presente na lâmina foi uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas nos dois lados do implante, de forma que sua média foi considerada como valor representativo da unidade (Figura 4). Assim, após a fotomicrografia das lâminas e salvas em arquivo TIFF, essas foram transportadas para o programa computacional Image J (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), que por meio da ferramenta “straight”, foi calculado o perímetro de osso formado na interface osso/implante (ELCOI) em micrômetros, como descrito anteriormente. E para

o cálculo de AON, a ferramenta “free hands” foi utilizada para mensurar a área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante em um.

Figura 4 - Imagens representativas de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para o cálculo dos parâmetros histométricos: ELCOI e AON. (A) setas vermelhas indicam o perímetro de osso localizado na interface osso/implante, corado pelo vermelho de alizarina; (B) a seta vermelha indica o cálculo de área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante



Fonte: Autor, 2023.

3.5.2 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)

Para a análise biomecânica, os animais deste grupo (n= 4 tíbias por grupo experimental) foram sedados com cloridrato de quetamina e xilazina, 28 dias após a instalação dos implantes, e tiveram as metáfises das tíbias acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante.

Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

Análises para tecidos descalcificados

3.5.3 Análise histológica

Nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios, 6 amostras de cada grupo, em cada período, foram encaminhados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento se iniciou com a descalcificação em EDTA (10%), de modo que as peças foram imersas em solução para descalcificação, a qual foi trocada semanalmente até se observar a diminuição da resistência à passagem de uma agulha para seringa carpule, demonstrando que a peça estava descalcificada. Posteriormente, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, foi feita a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina, seguida da obtenção de

lâminas com cortes de 5 µm de espessura.

Após a microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), sendo analisada a cronologia do reparo ósseo na região periimplantar, observando-se a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade do tecido ósseo, com avaliação da sua maturidade, assim como presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos. Para isso, as lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região das espiras mais centrais, inicialmente em uma objetiva de 20x, que conferiu uma visão ampla da área de tecido ósseo neoformado. Para observação da maturação e das características do tecido ósseo dos diferentes grupos, realizou-se fotomicrografias em uma objetiva de 100x.

Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, realizou-se, para cada amostra, três fotomicrografias em objetivas de 100x, em diferentes regiões da área periimplantar. Em seguida, tais imagens foram também submetidas à análise por meio do software Image J, utilizando a ferramenta “Grid”, com 130 pontos de intersecção, como meio de facilitar a visualização das células e dos vasos sanguíneos. Além disso, foi utilizada a ferramenta “Cell Counter Notice”, para a contagem propriamente dita das estruturas mencionadas.

3.5.4 Imunoistoquímica

Das lâminas confeccionadas que foram descalcificadas e incluídas em parafina, as de número ímpar foram destinadas às reações de imunoistoquímica, onde a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram: anti VEGF aos 14 dias pós-operatório e osteocalcina (OC) aos 28 dias.

O anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

3.6 Método de análise dos resultados

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos com as análises realizadas, foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (ZrHa vs Zr). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade para determinação do teste mais adequado (paramétrico versus não paramétrico). O nível de significância de 0,05 foi usado para todos os testes. O programa estatístico foi o SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

4Resultados

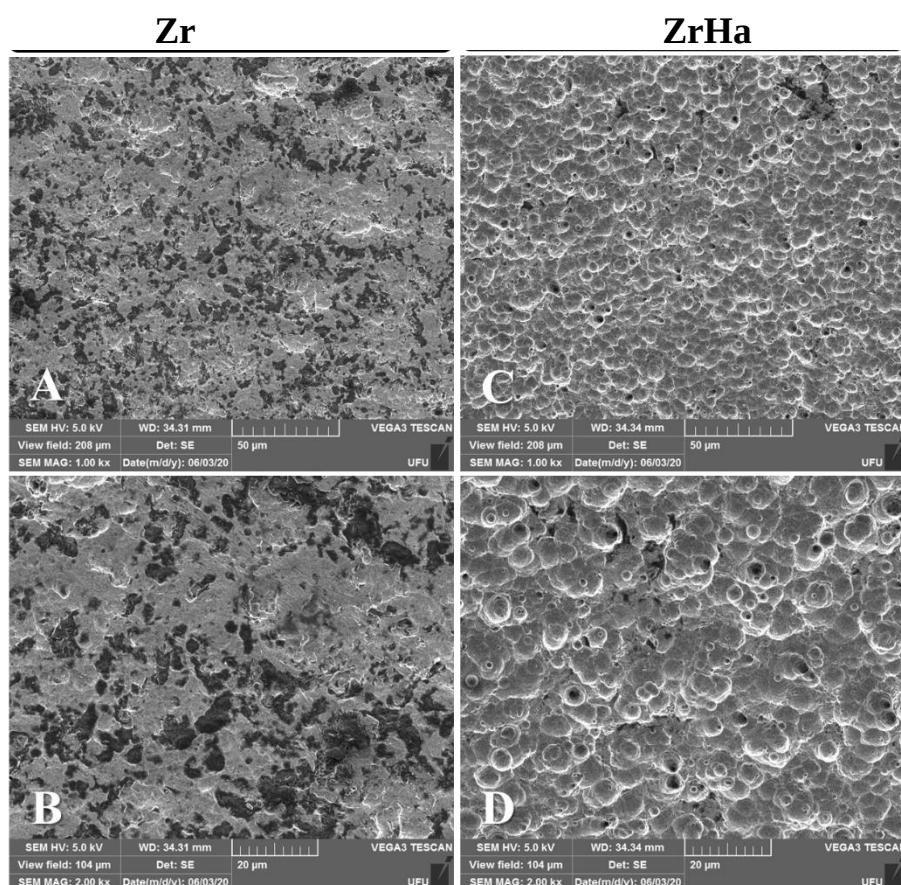
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização estrutural

4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias referentes ao grupo Zr demonstraram uma superfície bastante irregular com a formação de vales amplos indicados pelas regiões mais escuras da superfície. Enquanto isso, para o grupo ZrHa a superfície irregular foi preenchida por inúmeros poros com formato de “vulcão” e demonstrando ao mesmo tempo a incorporação de partículas na superfície com ausência dos vales profundos encontrados no outro grupo (Figura 5).

FIGURA 5 – Fotomicrografias referentes a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (magnitude de 1000x e 2000x) da superfície dos discos de Ticp para o grupo de superfície Zr (jateamento de zircônia com ataque ácido) e para de discos tratados

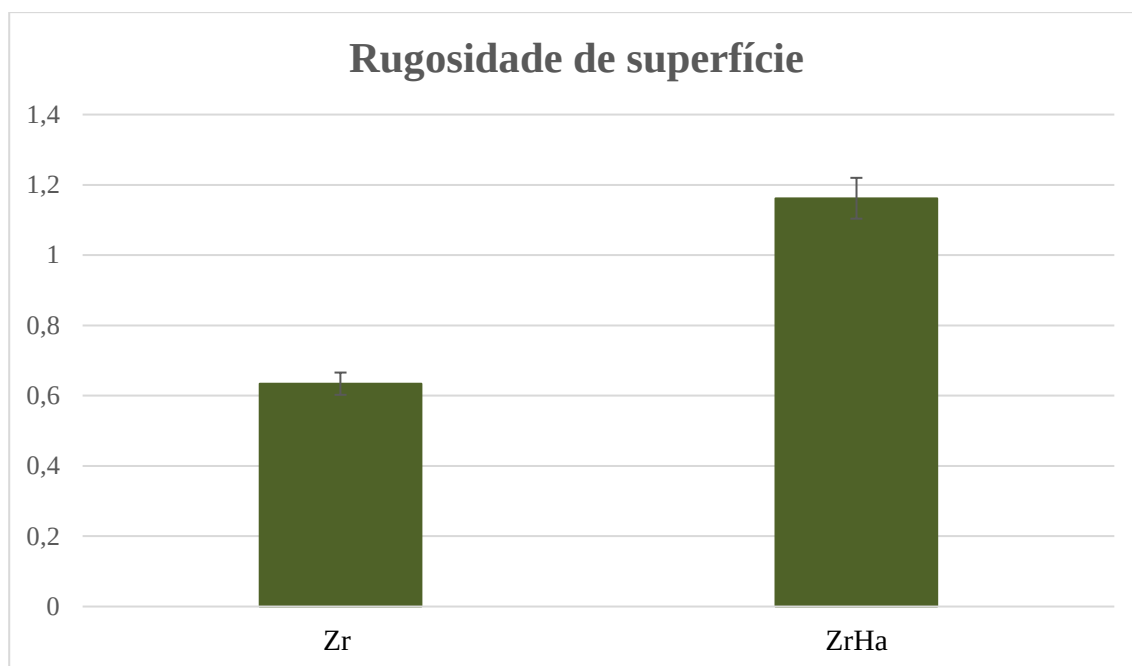


Fonte: Autor, 2023.

4.1.2 Perfilometria – análise de rugosidade de superfície

Com relação a rugosidade das superfícies avaliadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, apesar disso, houve uma tendência para o grupo ZrHa em apresentar maior rugosidade em comparação a Zr (Figura 6).

FIGURA 6 - Representação gráfica da média da rugosidade Ra da liga Ticp em função das modificações de superfície em ambos os grupos experimentais

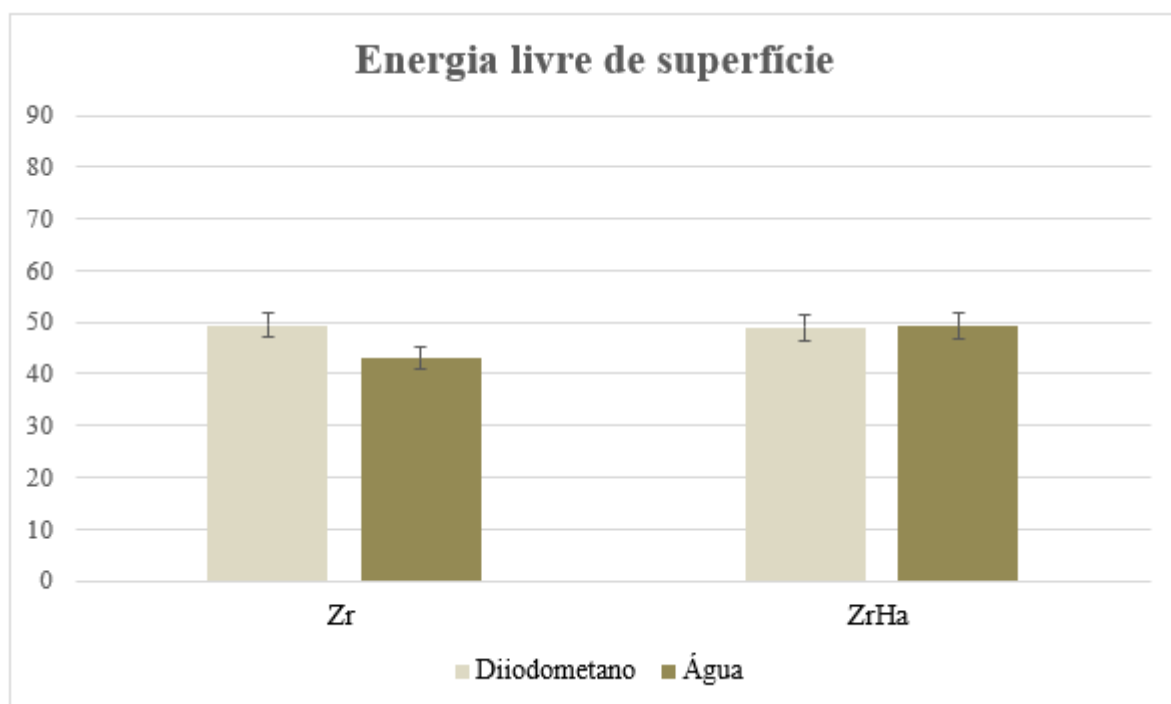


Fonte: Autor, 2023.

4.1.3 Energia livre de superfície

A análise de ELS avaliou componentes polares (água) e dispersivos (diiodometano) da liga Ticp e suas modificações em relação ao ângulo de contato, demonstrando resultados semelhantes para os grupos experimentais em relação a ambos os componentes (polar e dispersivo) (Figura 7).

FIGURA 7 - Representação gráfica da média da energia livre de superfície em relação ao ângulo de contato para água e diiodometano da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos Zr e ZrHa.

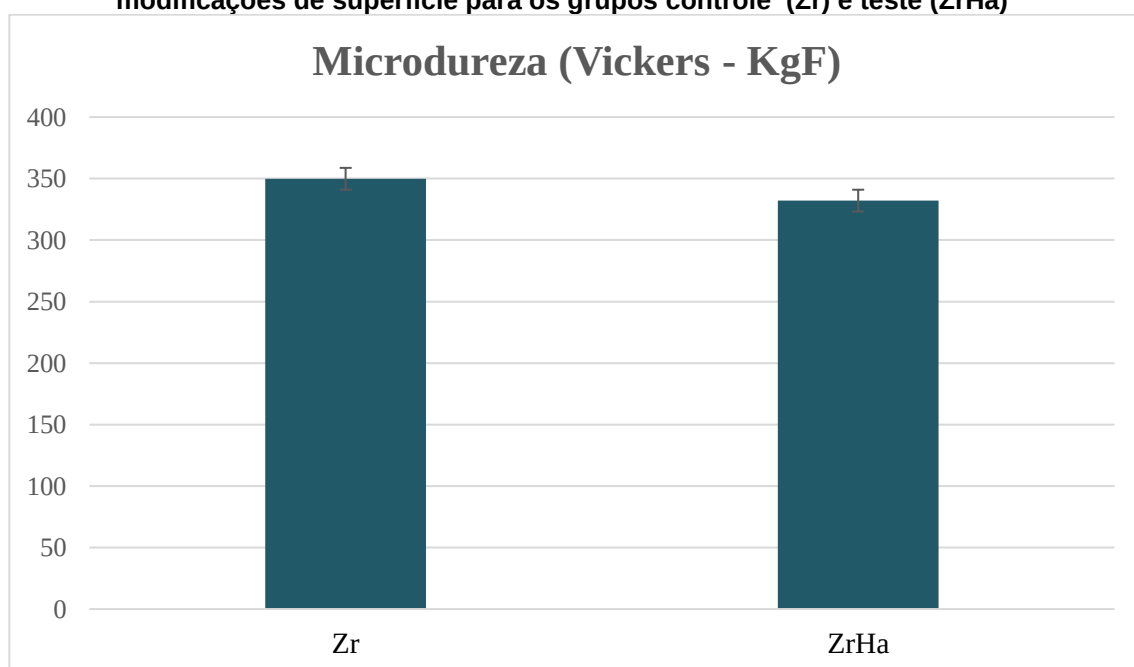


Fonte: Autor, 2023.

4.1.4 Análise de microdureza

Por meio desta análise foi possível observar uma microdureza semelhante entre os grupos experimentais (Figura 8).

FIGURA 8 – Representação gráfica da média da microdureza de Vickers da liga Ticp em função das modificações de superfície para os grupos controle (Zr) e teste (ZrHa)

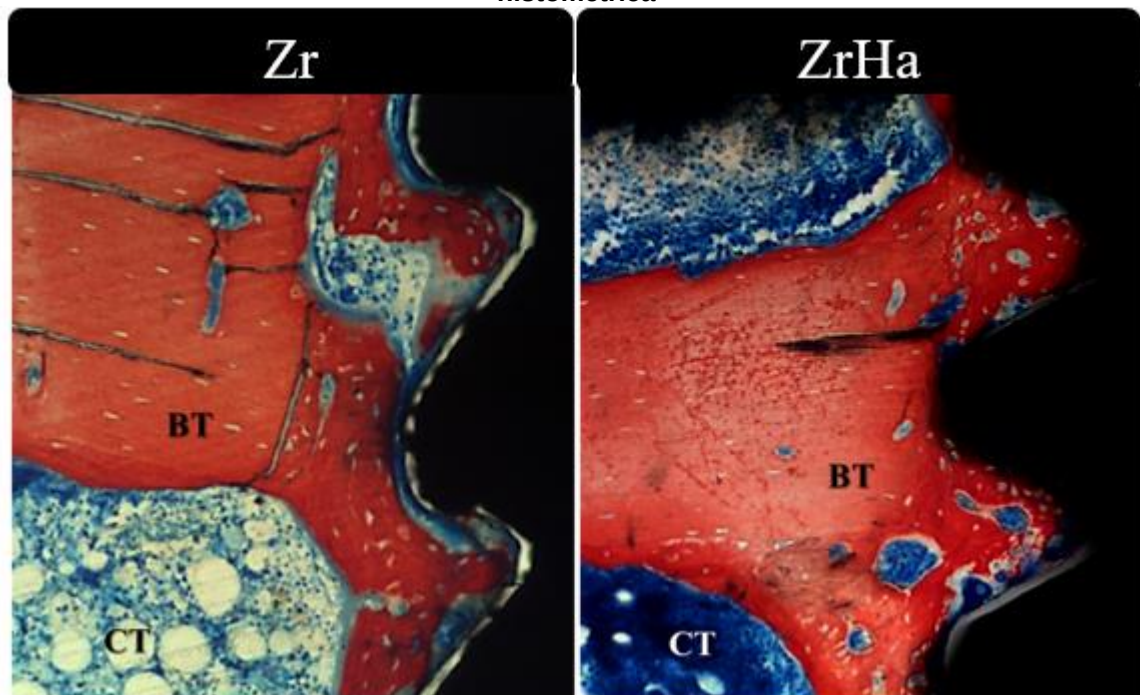


Fonte: Autor, 2023.

4.2 Histometria

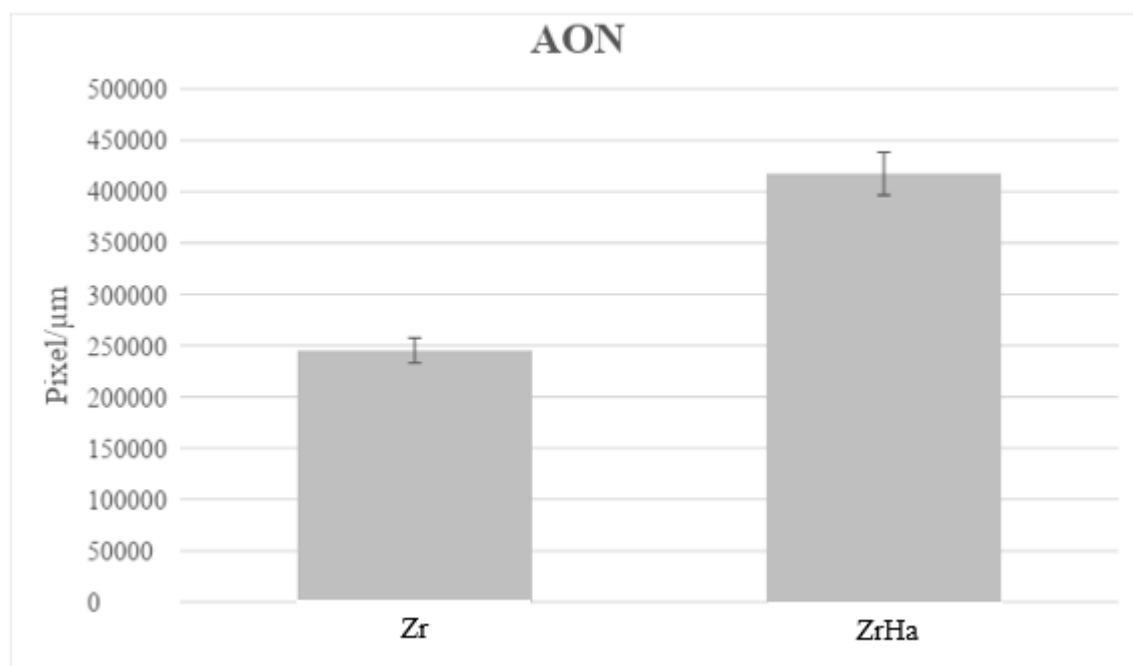
Por meio da análise histométrica (Figura 9) foi possível observar um perfil reparacional mais favorável à osseointegração para o grupo ZrHa visto que este apresentou uma Área de osso neoformado (AON) superior quando comparada ao grupo Zr. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,178$) (Figura 10). Além disso, no tocante à Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) também foi possível notar uma ligeira superioridade para o grupo ZrHa, sem que houvesse diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,691$) (Figura 11).

FIGURA 9 - Imagens representativas do tecido ósseo periimplantar observado por meio da análise histométrica



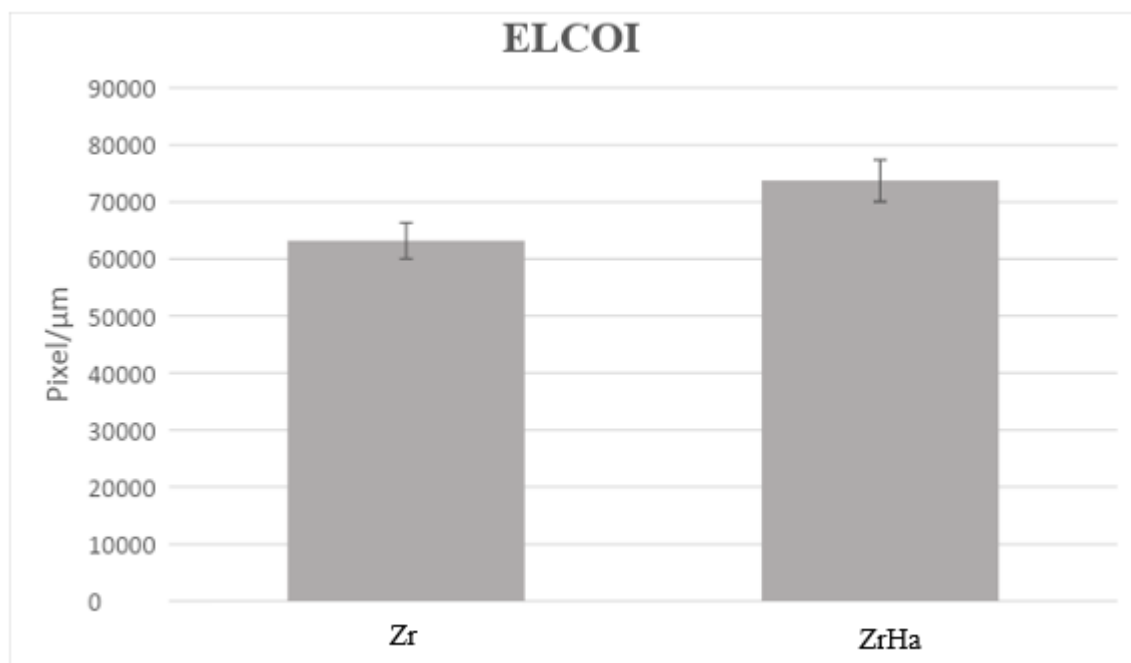
Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 10 – Representação gráfica da análise de Área de osso neoformado demonstrando superioridade para o grupo ZrHa ($p=0,178$)



Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 11 - Representação gráfica da análise de Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) para os grupos experimentais ($p=0,691$)



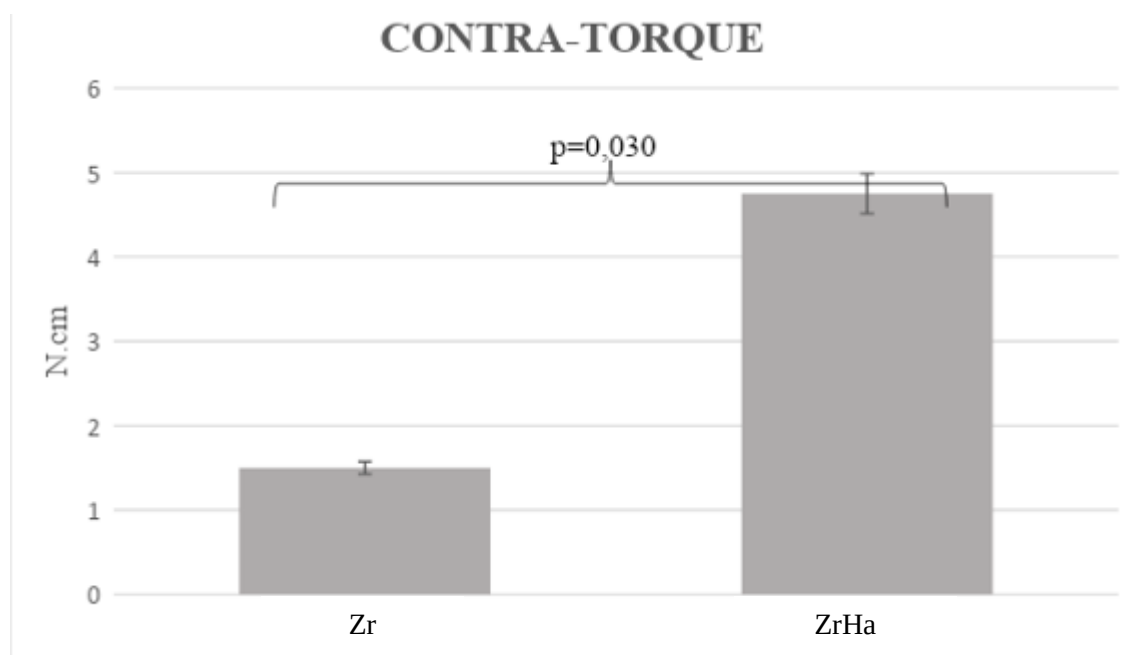
Fonte: Autor, 2023.

4.3 Análise biomecânica dos implantes (contra-torque)

A análise biomecânica de contra-torque demonstrou que os implantes tratados

por meio do jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo ZrHa) apresentam um maior pico de torque durante o rompimento da interface osso/implante por meio do torquímetro, com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,030$). (Figura 12).

FIGURA 12 – Representação gráfica da análise biomecânica de contra-torque realizada por meio de torquímetro digital, evidenciando maior torque para o grupo teste para rompimento da interface formada entre tecido ósseo e implante.

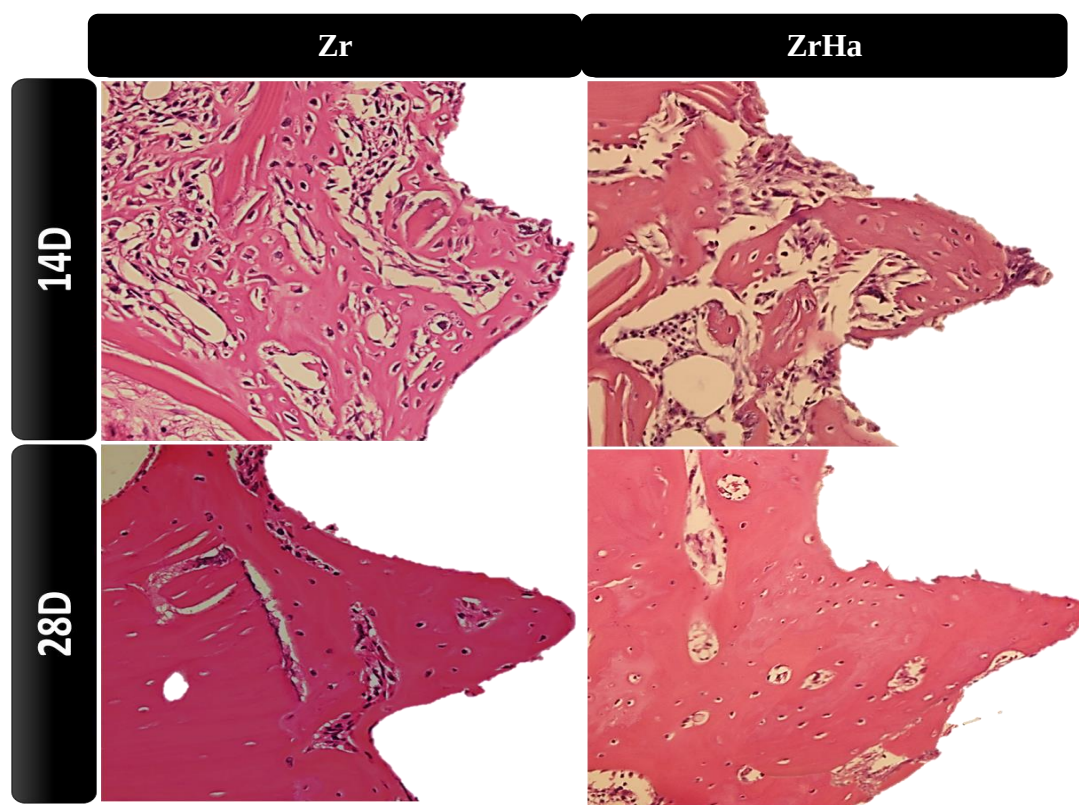


Fonte: Autor, 2023.

4.4 Análise histológica

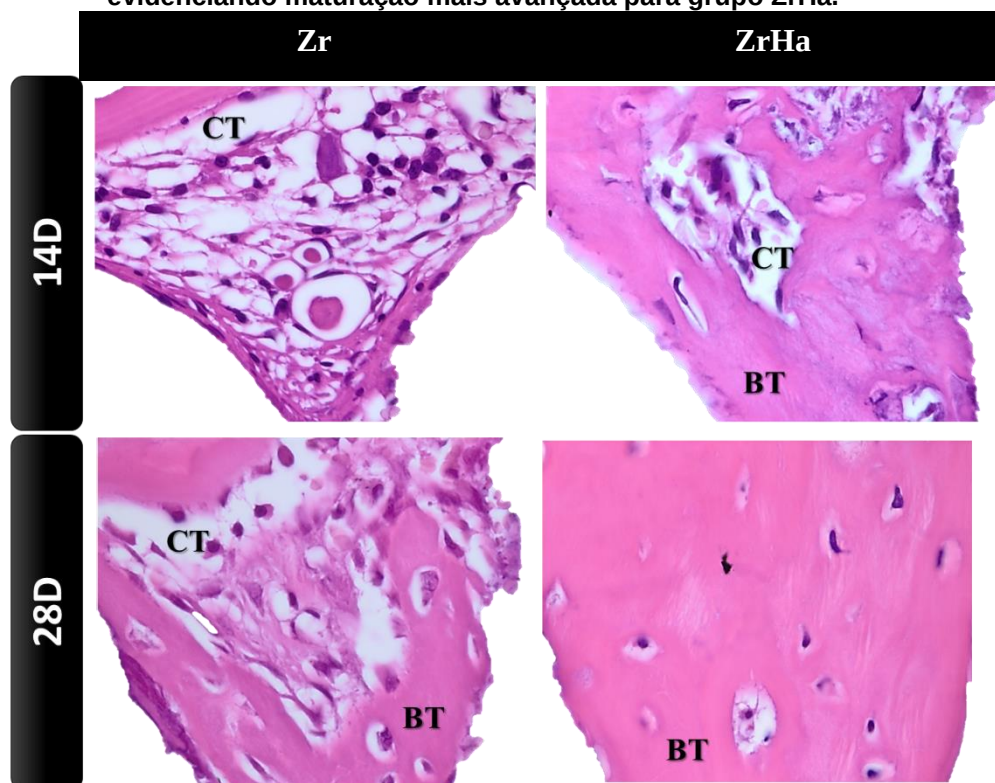
Por meio da análise histológica foi possível observar, em fotomicrografias com objetiva de 20x (Figura 13) e de 100X (Figura 14), as características e o grau de maturação do tecido ósseo das espiras formadas durante a osseointegração dos implantes de ambos os grupos experimentais. Aos 14 dias, foi observado para o grupo Zr um tecido ainda bastante imaturo, com grande quantidade de células e de tecido conjuntivo entremeado, já para o grupo ZrHa, observou-se maior preenchimento por tecido ósseo, com característica de maturação mais avançada e menor quantidade de células. Aos 28 dias, apesar de ambos os grupos demonstrarem uma formação óssea satisfatória, o grupo ZrHa apresentou maior destaque por mostrar um tecido ósseo com estrutura mais organizada e madura.

FIGURA 13 - Fotomicrografias em objetiva de 20x para representação das características do tecido ósseo periimplantar para ambos os grupos (Zr e ZrHa) aos 14 e 28 dias pós-operatório



Fonte: Autor, 2023.

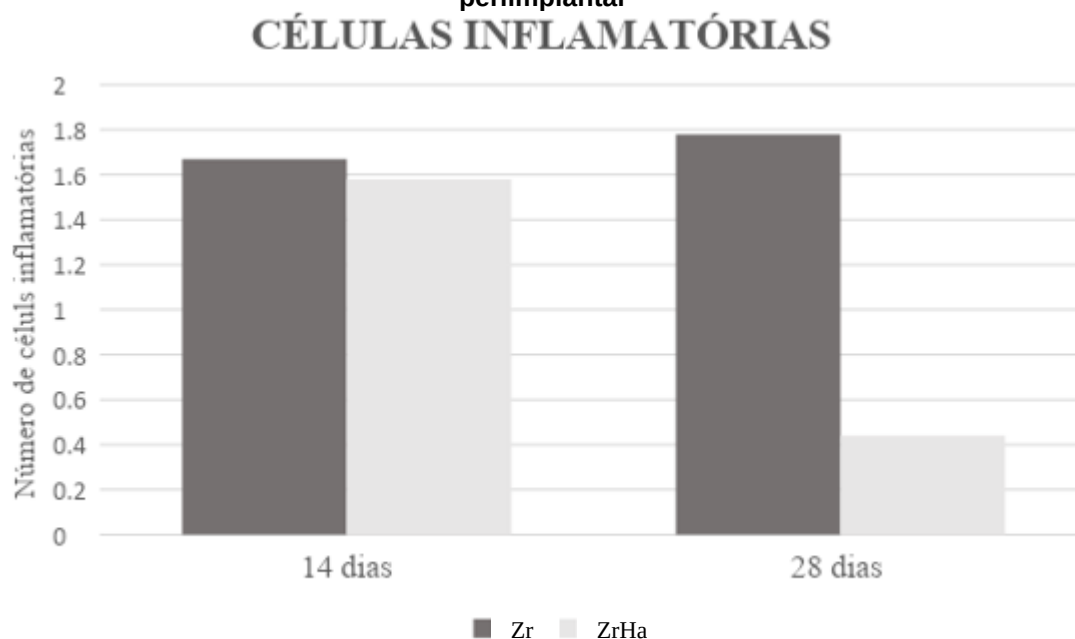
FIGURA 14 – Fotomicrografias em objetiva de 100x para representação da maturação do tecido ósseo da espora mais central de cada grupo experimental (Zr e ZrHa) aos 14 e 28 dias pós-operatório, evidenciando maturação mais avançada para grupo ZrHa.



Fonte: Autor, 2023.

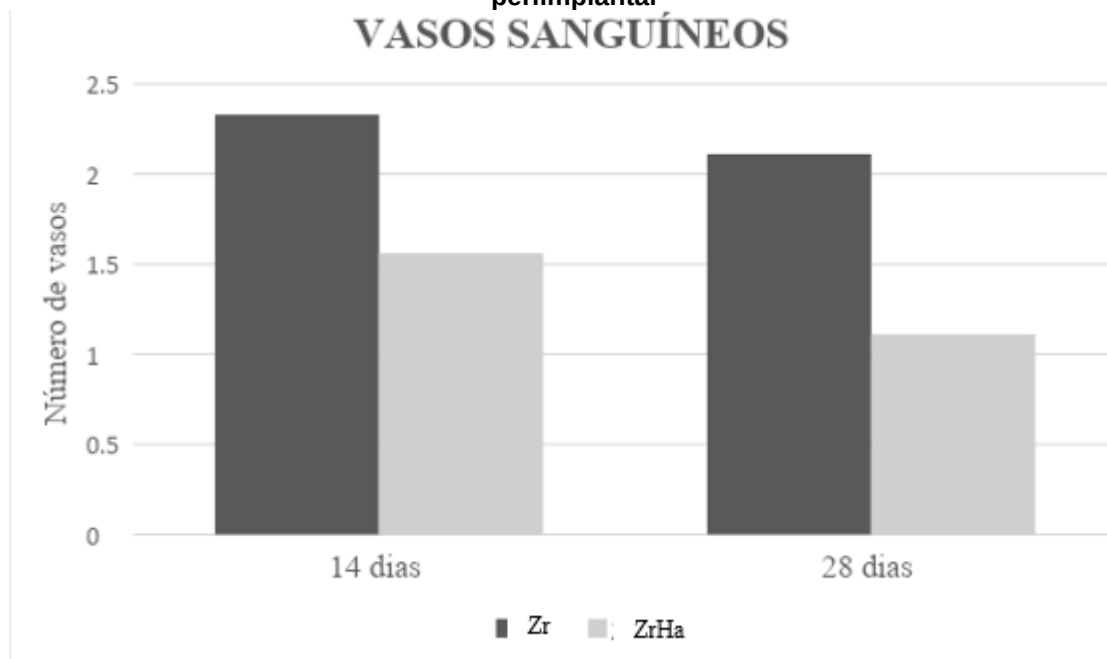
Além disso, esta análise permitiu a verificação do perfil inflamatório relacionado aos grupos experimentais, por meio de fotomicrografias de 100x, em que foram quantificadas as células inflamatórias e os vasos sanguíneos observados nas imagens. Apesar de o grupo ZrHa apresentar um menor número de células inflamatórias aos 28 dias pós-operatório, ambos os grupos demonstraram um perfil inflamatório bem similar quanto a presença celular e também quanto a contagem de vasos sanguíneos, reafirmando a biocompatibilidade e ausência de efeito citotóxico em ambas as superfícies utilizadas neste estudo (Figura 15 e 16). Não foram observadas diferenças significativamente estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$).

FIGURA 15 – Representação gráfica referente a contagem de células inflamatórias em região periimplantar



Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 16 – Representação gráfica referente a contagem de vasos sanguíneos em região periimplantar



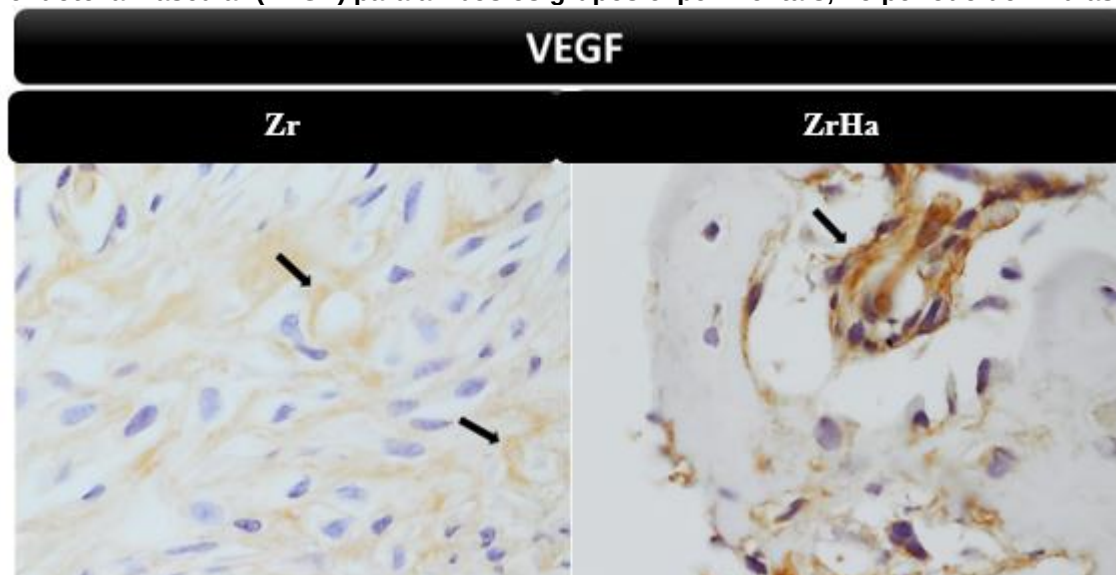
Fonte: Autor, 2023.

4.5 Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram efetivas para identificar as marcações analisadas nesta proposta. As imunomarcações foram observadas como uma cor amarronzada confinada no citoesqueleto do citosol celular e matriz extracelular para VEGF e do citosol celular para OCN. A figura 17 e 18 representam o padrão de imunomarcação para os períodos de 14 dias para VEGF e 28 dias para OCN.

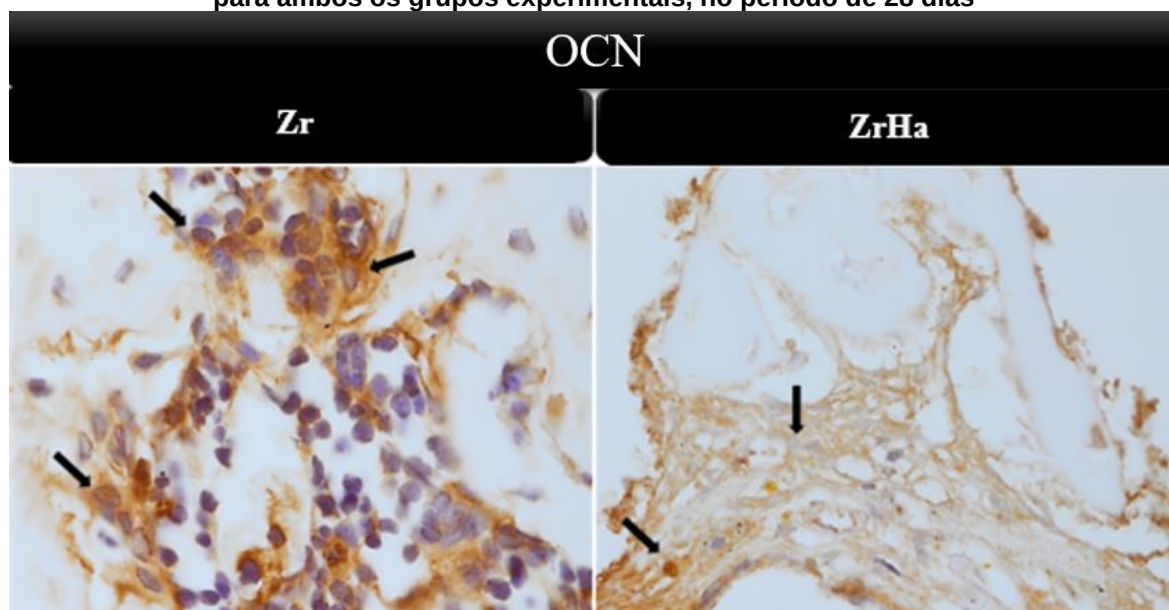
VEGF marcou principalmente fibroblastos, com maior distribuição na maior parte das lâminas no grupo Zr. OCN marcou osteoblastos de forma similar para ambos os grupos, numa intensidade moderada, com mais de 50% da lâmina com as células coradas.

FIGURA 17 – Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcação para Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para ambos os grupos experimentais, no período de 14 dias



Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 18 – Fotomicrografias (100x) representativas da imunomarcação para Osteocalcina (OCN) para ambos os grupos experimentais, no período de 28 dias



Fonte: Autor, 2023.

5Discussão

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio deste estudo *in vitro* e *in vivo* foram esclarecedores com relação às propriedades de otimização do reparo ósseo periimplantar relacionados a texturização de superfície por meio do jateamento de zircônia e ataque ácido com adição de nanopartículas de hidroxiapatita (grupo ZrHa).

Sabe-se que as técnicas de texturização dos implantes dentários influenciam diretamente no fenômeno de osseointegração atuando desde a diferenciação celular até a formação de matriz óssea calcificada (THAKRAL *et al.*, 2014). Neste estudo, observou-se que a texturização ZrHa foi capaz de alterar as características estruturais da superfície, levando a uma morfologia mais complexa, com presença de inúmeros poros semelhantes a “vulcões” distribuídos homogeneamente pela amostra, o que gera uma maior área de superfície disponível para a interação de proteínas e células da linhagem osteogênica. Concomitante a isso, tem-se um resultado de energia livre de superfície, que apesar de não apresentar diferenças em relação ao grupo Zr, é bastante favorável à adsorção protéica necessária para os estágios iniciais do reparo ósseo. Ainda em relação às características da superfície, se deve pensar nas suas propriedades mecânicas, que também se apresentaram bastante semelhantes aos implantes atualmente já comercializados (Zr) em relação a rugosidade de superfície e microdureza, reforçando a viabilidade da aplicação do tratamento aqui testado nas reabilitações orais implantossuportadas.

Em tais reabilitações, é importante lembrar que as superfícies dos implantes osseointegráveis devem integrar-se com três diferentes tipos de tecidos durante as fases iniciais da cicatrização: epitelial, conjuntivo e ósseo, a fim de que possam, de forma previsível, ser realmente duradouros (LOUROPOULOU *et al.*, 2015). Diante disso, o perfil inflamatório associado a reparação periimplantar pode ser um preditor do prognóstico relacionado ao tratamento. Neste estudo, ambas as superfícies utilizadas se demonstraram, por meio da análise de células inflamatórias e número de vasos sanguíneos em região periimplantar, aos 14 e 18 dias pós-operatório, com resposta inflamatória compatível com o procedimento cirúrgico, sem capacidade de causar reações teciduais exacerbadas e reação de toxicidade, sugerindo que se tratam de superfícies altamente biocompatíveis.

Com relação a integração inicial do implante com o tecido ósseo, são consideradas mais favoráveis, aquelas superfícies que levam a otimização da série de eventos coordenados necessários para a neoformação óssea periimplantar, que incluem

a adsorção proteica, proliferação, diferenciação celular e a deposição de matriz óssea (TRISI *et al.*, 2003). Nesse sentido, por meio da análise histológica, foi possível observar em fotomicrografias com objetiva de 20x e de 100x, que aos 14 dias o grupo Zr apresentava ainda um tecido ósseo bastante imaturo, com grande quantidade de células e de tecido conjuntivo entremeado as regiões de precipitação de matriz óssea, enquanto, para a superfície ZrHa havia um maior preenchimento por tecido ósseo, com maturação bem mais avançada. O mesmo se repetiu aos 28 dias, onde ZrHa apresentou um tecido ósseo com estrutura mais madura e organizada.

Atrelado a isso, a análise de imunoistoquímica foi efetiva para identificação das marcações propostas. A imunomarcação para VEGF aos 14 dias discretamente mais intensa para Zr demonstra mais uma vez que o grupo ZrHa estava já em uma fase mais avançada do reparo ósseo por meio da redução da expressão desta proteína e consequente redução dos vasos sanguíneos na região de reparo. Já em relação a OCN avaliada aos 28 dias pós-operatório, confirma que nesse período, ambos os grupos foram capazes de reparar o osso periimplantar na tíbia de ratas osteoporóticas.

Outro fator de grande importância para o prognóstico e longevidade dos implantes diz respeito a estabilidade primária e secundária, que por sua vez, estão atrelados a qualidade e quantidade óssea disponível (DAVIES, 2003). Pode-se considerar, a partir dos resultados obtidos por meio desta pesquisa, que a superfície texturizada por meio do jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita tem um perfil mais favorável com relação a estabilidade secundária, visto que durante a realização de análise biomecânica, os implantes com tal superfície apresentam um maior pico de torque durante o rompimento da interface osso/implante, obtido por meio de torquímetro ($p=0,030$). Bons resultados relacionados a estabilidade secundária relacionada a este tratamento também foram observados por outros autores, reforçando positivamente os dados aqui obtidos (BACCHELLI *et al.*, 2009; FRANCHI *et al.*, 2004).

O resultado favorável associado a análise de contra-torque foi ainda corroborado por meio da histometria, onde, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, houve ocorrência de uma tendência a maior área de osso neoformado (AON) quando comparada ao Zr. O que também foi observado no tocante à extensão linear de contato osso/implante (ELCOI). Esses são achados encorajadores e que atuam de acordo com o que já foi postulado na literatura referente a resposta reparacional mais favorável ao jateamento com zircônia comparado ao duplo ataque ácido (FRANCHI *et al.*, 2007). A incorporação das nanopartículas de hidroxiapatita gera ainda uma superfície com propriedades químicas que mimetizam a composição do tecido ósseo, otimizando a adsorção de proteínas e células da linhagem osteogênica.

Diante dos resultados favoráveis conquistados por meio deste estudo, na busca por meios alternativos que otimizem o reparo ósseo especialmente em situações críticas, como em condições sistêmicas de pobre resposta metabólica óssea, tem-se que a texturização por jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita é um tratamento promissor, contando com a capacidade de alterar a morfologia e composição química da superfície de implantes, com aceleração da maturação do tecido ósseo e grande influência positiva na estabilidade secundária dos implantes osseointegráveis.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, o jateamento de zircônia com ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita utilizado para modificação da superfície dos implantes osseointegráveis foi favorável ao reparo ósseo periimplantar, sendo importante a realização de mais estudos que reforcem tais resultados para a consolidação clínica.

Referências

REFERÊNCIAS

- BACCHELLI, B.; GIAVARESI, G.; FRANCHI, M.; MARTINI, D.; DE PASQUALE, V.; TRIRÈ, A, et al. Influence of a zirconia sandblasting treated surface on peri-implant bone healing: An experimental study in sheep. **Acta Biomaterialia**. p 2246-2257. 2009.
- BARÃO, V. A. R.; MATHEW, M. T.; ASSUNÇÃO, W. G.; YUAN, JC-C.; WIMMER, M. A.; SUKOTJO, C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. **Clinical Oral Implants Research**. 2012.
- BARÃO, V. A. R.; RICOMINI-FILHO, A. P.; FAVERANI, L. P.; DEL BEL CURY, A. A.; SUKOTJO, C.; MONTEIRO, D. R, et al. The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti. **Materials Science and Engineering**: C. 2015.
- BUSER, D.; BROGGINI, N.; WIELAND, M.; SCHENK, R. K.; DENZER, A. J.; COCHRAN, D. L et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **Journal of Dental Research**. 2004.
- CHAI, W. L.; RAZALI, M.; MOHARAMZADEH, K.; ZAFAR, M. S. The hard and soft tissue interfaces with dental implants. In: Zafar MS, Khurshid Z, Khan AS, Najeeb S, Sefat F, editors. **Dental implants**. 2020.
- CHRCANOVIC, B. R.; CUSTÓDIO, A. L. N. Mandibular fractures associated with endosteal implants. **Oral and Maxillofacial Surgery**. 2009.
- COMBE, E. C.; OWEN, B. A.; HODGES, J. S. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. **Dental Materials**. p 262-268. 2004.
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**. 2003.
- DE BRUYN, H.; CHRISTIAENS, V.; DOORNEWAARD, R.; JACOBSSON, M.; COSYN, J.; JACQUET, W et al. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. **Periodontology 2000**. p 218- 227. 2017
- FAVERANI, L. P.; ASSUNÇÃO, W. G.; DE CARVALHO, P. S. P.; YUAN, J. C-C.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T et al. Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching. **Plos one**. 2014.

FAVERANI, L. P.; BARÃO, V. A .R.; RAMALHO-FERREIRA, G.; FERREIRA, M. B.; GARCIA-JÚNIOR, I. R.; ASSUNÇÃO, W. G. Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography. **Journal of Biomedical Materials Research Part B. Applied Biomaterials**. 2014.

FAVERANI, L. P.; BARAO, V. A. R.; PIRES, M. F. A.; YUAN, JC-C.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T, et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti–6Al–4V alloy subjected to different mouthwash solutions. **Materials Science and Engineering: C**. 2014.

FAVERANI, L. P; BARAO, V. A. R; PIRES, M. F. A.; YUAN, J. C-C.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti–6Al–4V alloy subjected to different mouthwash solutions. **Materials Science and Engineering: C**. 2014.

FRANCHI, M.; BACCHELLI, B.; GIAVARESI, G.; DE PASQUALE, V.; MARTINI, D.; FINI, M, et al. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. **Journal of Periodontology**. p 879-888. 2007.

FRANCHI, M.; ORSINI, E.; TRIRE, A.; QUARANTA, M.; MARTINI, D.; PICCARI, G. G, et al. Osteogenesis and morphology of the peri-implant bone facing dental implants. **TheScientificWorldJournal**. p 1083-1095. 2004.

GLÖSEL, B.; KUCHLER, U.; WATZEK, G.; GRUBER, R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. 2010.

HARRASSER, N.; GORKOTTE, J.; OBERMEIER, A.; FEIHL, S.; STRAUB, M.; SLOTTA-HUSPENINA, J. et al. A new model of implant-related osteomyelitis in the metaphysis of rat tibiae. **BMC Musculoskeletal Disorders**. 2016.

HATAMLEH, M. M.; WU, X.; ALNAZZAWI, A.; WATSON, J.; WATTS, D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. **Dental Materials**. p 676- 683. 2018.

HURST, D. Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure. **Evidence-Based Dentistry**. 2014.

IVANOFF, C. J.; WIDMARK, G.; HALLGREN, C.; SENNERBY, L.; WENNERBERG, A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. **Clinical Oral Implants Research**. 2001.

JEMAT, A.; GHAZALI, M. J.; RAZALI, M.; OTSUKA, Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. **BioMed Research International**. 2015.

KUCHLER, U.; LUVIZUTO, E. R.; MUÑOZ, F.; HOFBAUER, J.; WATZEK, G.; GRUBER, R. Bone healing around titanium implants in two rat colitis models. **Clinical Oral Implants Research**. p 224-229. 2013.

LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **Journal of Dental Research**. p 584-595. 2006.

LERNER, U. H. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. **Journal of Dental Research**. p 596-607. 2006.

LEROITH, D. Foreword. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2012.

LOUROPOULOU, A.; SLOT, D.E.; VAN DER WEIJDEN, F. Influence of mechanical instruments on the biocompatibility of titanium dental implants surfaces: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**. 2015.

OLIVEIRA, N.; GUASTALDI, F.; PERROTTI, V.; HOCHULI-VIEIRA, E.; GUASTALDI, A.C.; PIATTELLI, A et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. p 427-437. 2013.

QUEIROZ, T. P.; SOUZA F.; GUASTALDI, A. C.; MARGONAR, R.; GARCIA-JÚNIOR, I. R.; HOCHULI-VIEIRA, E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**. p 896-903. 2013.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L. P.; GROSSI-OLIVEIRA, G. A.; OKAMOTO T, OKAMOTO R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of Biomedical Optics**. 2015.

RAPAPORT, R. Preface. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2012.

RENDINA, E.; HEMBREE, K. D.; DAVIS, M. R.; MARLOW, D.; CLARKE, S. L.; HALLORAN, B. P.; et al. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. **PloS One**. 2013.

RODRIGUEZ, L.; SUNDARAM, P. A.; ROSIM-FACHINI, E.; PADOVANI, A. M.; DIFFOOT-CARLO, N. Plasma electrolytic oxidation coatings on γ TiAl alloy for potential biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. p 988-1001. 2014.

STEINEMANN, S. G. Titanium: the material of choice? **Periodontology** 2000. 1998.

TAVARES, M. G.; TAMBASCO, DE OLIVEIRA P.; NANJI, A.; HAWTHORNE, A. C.; ROSA, A. L.; XAVIER, S. P. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. **Clinical Oral Implants Research**. p 452-458. 2007.

THAKRAL, G.; THAKRAL, R.; SHARMA, N.; SETH, J.; VASHISHT, P. Nanosurface - the future of implants. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 2014.

THORMANN, U.; EL KHAWASSNA, T.; RAY, S.; DUERSELEN, L.; KAMPSCHULTE, M.; LIPS, K et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. **Injury**. 2014.

TRISI, P.; LAZZARA, R.; REBAUDI, A.; RAO, W.; TESTORI, T.; PORTER, S. S.; Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. **Journal of Periodontology**. p 945-956. 2003.

WÄLIVAARA, B.; ARONSSON, B. O.; RODAHL, M.; LAUSMAA, J.; TENGVALL P. Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. **Biomaterials**. 1994.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**. p 172-184. 2009.

ZECHNER, W.; TANGL, S.; FÜRST, G.; TEPPER, G.; THAMS, U.; MAILATH, G et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. **Clinical Oral Implants Research**. 2003.

ANEXO I – 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 "**Avaliação da atividade antimicrobiana, comportamento eletroquímico e osteogênico em superfícies de Ticip texturizadas por métodos experimentais envolvendo jateamento de zircônia, ataque ácido e adição de nanopartículas de hidroxiapatita**", Processo FOA nº 00528-2018, sob responsabilidade de Wirley Gonçalves Assunção apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Novembro de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Outubro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Novembro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of antimicrobial activity, electrochemical, and osteogenic behavior in Ticip surfaces textured by experimental methods involving zirconia blasting, acid etching and addition of hydroxyapatite nanoparticles**", Protocol FOA nº 00528-2018, under the supervision of Wirley Gonçalves Assunção presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 13, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 13, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 13, 2021.

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

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