



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

Lara Cristina Cunha Cervantes

Avaliação da resposta óssea de uma superfície de implante
revestida com odanacatib em ratas ovariectomizadas. Estudo
experimental *in vivo*

Araçatuba - SP
2023

Lara Cristina Cunha Cervantes

Avaliação da resposta óssea de uma superfície de implante
revestida com odanacatib em ratas ovariectomizadas. Estudo
experimental *in vivo*

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba – Universidade
Estadual Paulista (Unesp), para a
obtenção do Grau de “Doutora em
Odontologia” - Cirurgia e Traumatologia
Bucamaxilofacial.

Orientador: Prof. Ass. Idelmo Rangel
Garcia Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Reinhard Gruber

Araçatuba - SP
2023

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C419a Cervantes, Lara Cristina Cunha.
Avaliação da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com odanacatib em ratas ovariectomizadas : estudo experimental in vivo / Lara Cristina Cunha Cervantes. - Araçatuba, 2023
45 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior
Coorientador: Prof. Reinhard Gruber

1. Propriedades de superfície 2. Antirreabsortivos 3. Implantes dentários I. T.

Black D7
CDD 617.64

Aos meus pais, Sandra Mara Cunha Cervantes e Pedro Cesar Cervantes, por tornarem possível a concretização de mais um sonho. Apesar de todas as dificuldades, sempre acreditaram na minha capacidade e investiram para que eu me tornasse a pessoa e a profissional que sou hoje. Obrigada por entenderem o que esse título significa pra mim e compartilharem comigo as dores e as vitórias que me trouxeram até aqui.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus por me proporcionar essa oportunidade, por ser minha fortaleza e meu guia. O que tornou possível a realização de mais um sonho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, que através do projeto CAPES-PRINT fomentou a bolsa de Doutorado Sanduíche na Universidade de Medicina de Viena, possibilitando a realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador **Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, ao qual eu me inspiro e que forneceu todo o apoio necessário para que eu pudesse desenvolver este e outros projetos. Além de permitir o meu desenvolvimento pessoal e profissional através do seu incentivo e das oportunidades que sempre me proporcionou. Obrigada por ser meu tutor acadêmico, clínico, e sempre caminhar comigo, professor.

À **Professora Roberta Okamoto**, por ser uma pessoa que sempre contribui de forma substancial aos nossos projetos. Com seu vasto conhecimento em pesquisa, foi uma pessoa muito importante para que esse projeto fosse realizado no exterior. Profa, obrigada por sempre nos “estender a mão”.

Ao **Professor Francisley Ávila Souza**, por ter uma contribuição muito significativa para a realização desse projeto. Além de ter sido meu tutor durante o doutorado sanduíche pelo CAPES-Print, sempre trabalha em conjunto com o nosso grupo para que os resultados sejam ainda mais relevantes. Obrigada por sempre me apoiar, professor.

Ao **Professor André Luís da Silva Fabris**, pois sempre esteve disponível para me auxiliar nos trabalhos desenvolvidos durante o doutorado e por me incentivar a crescer na vida acadêmica e clínica. Obrigada por todos os conselhos e pela amizade.

Ao **Professor Fábio Roberto de Souza Batista**, que foi meu colega de pós-graduação e agora, de profissão. Obrigada por aceitar compor a banca da minha tese e por dividir seus conhecimentos comigo, contribuindo para a melhoria do nosso trabalho.

To **Professor Reinhard Gruber**, that contributes significantly with this study development and to teach me a different technique in research, the cell culture.

Besides that, his advice and his teaching way were a great learning for me during the exchange program. Professor, it was an honour for me spend this time learning in your lab and a huge experience for my life also. Thank you so much.

To **Doctor Stefan Tangl**, to teaching me his protocol and provide all the resources to develop this study. I had a great time at the “Core Facility Hard Tissue and Biomaterial Research, Karl Donath Laboratory”, thank you so much.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, por ser a instituição de ensino responsável por proporcionar minha formação acadêmica.

Aos **funcionários do Departamento de Cirurgia e Diagnóstico**, que auxiliam e dão suporte para que todos os trabalhos sejam desenvolvidos com maestria.

Ao **Gabriel Mulinari**, que compartilhou comigo toda a sua experiência e fez o primeiro contato com a equipe do exterior.

À **Natália Sanches**, por ser meu time quando éramos apenas nós duas trabalhando para que esse estudo saísse do papel, e pela amizade nos momentos mais difíceis.

To **Lab colleagues (Layla, Zahra, Jila, Anes, Ana Flávia, Mariane, Shao, Zohreh, Azarakhsh, Carina, Ana, and Kevin)**. So many times, they have stopped their work to explain me how to do my work, supervise and teach me about the techniques used in both laboratories. Also, they were my family for one year, thank you for all meetings, talks, lunches, patience, and the teamwork. I miss all of you.

Aos **Amigos de pós-graduação (Carolina, Pedro, Ana Flávia e Henrique)**, por serem as pessoas que dividiram comigo um dos momentos mais difíceis e mais realizadores da minha vida. Obrigada por sempre estarem aqui por mim e a crescerem comigo nessa profissão que tanto amamos. Contem sempre comigo!

À **minha família (Sandra Mara, Pedro Cesar, Ana Elisa, Cesar Augusto, Benício, Neide, Denyrce, Zenaide, Francisco, Nair, Benedito)**, por serem meu suporte e minha base. Obrigada por contribuírem para o meu crescimento em todos os âmbitos da minha vida e por estarem presentes nos momentos mais difíceis e nos de comemoração. Amo vocês!

Cervantes LCC. Avaliação da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com odanacatib em ratas ovariectomizadas. Estudo experimental *in vivo* [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2022.

RESUMO

Atualmente novos princípios ativos de função reabsortiva têm ganhado campo de estudo para avaliar seus mecanismos e comportamento biológico. Com isso, um novo antirreabsortivo, inibidor da catepsina K tem apresentado efeito positivo na osseointegração. Este estudo tem como objetivo avaliar a resposta óssea da superfície de implantes revestida por duplo ataque ácido e Odanacatib (MK-0822) em ratas ovariectomizadas. Neste estudo foram utilizadas ratas (Albinus, Wistar) ovariectomizadas ou sham (placebo). Cinquenta e dois (52) tiveram as superfícies revestidas por duplo ataque ácido e MK-0822 a 0,06 mg/ml através do método biomimético, e 48 implantes foram instalados em tíbias de ratas ovariectomizadas ou sham. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-x (EDS) foram realizadas em 4 implantes após tratamento de superfície, para análise da topografia e composição química, além da realização da análise do ângulo de contato em 16 discos de titânio comercialmente puro tratados com as mesmas superfícies. Aos 15 e 40 dias após instalação de implantes (n=6), foi realizada microtomografia computadorizada. Dados quantitativos foram avaliados adotando-se o nível de significância $p < 0,05$. Além dos resultados topográficos favoráveis para os grupos tratados com MK-0822, os resultados microtomográficos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos SHAM e OVX na maioria dos parâmetros ($p < 0,05$). Ainda assim, os grupos tratados com MK-0822 apresentaram resultado semelhante ou maior, porém sem diferença estatística, em relação ao grupo controle em todos os parâmetros (TV, BV, BV/TV, Tb.Sp e Tb.N).

Palavras-chave: Propriedades de Superfície. Antirreabsortivos. Implantes Dentários.

Cervantes LCC. Evaluation of the bone response of an odanacatib coated implant surface in ovariectomized rats. *In vivo* experimental study [thesis]. Araçatuba: São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry; 2022.

ABSTRACT

Currently new active principles of resorptive function have gained field of study to evaluate their mechanisms and biological behavior. Thereby a new anti-absorbent, cathepsin K inhibitor has had a positive effect on osseointegration. This study aims to evaluate the bone response of the surface of implants coated by double acid-etched and Odanacatib (MK-0822) in ovariectomized rats. In this study, either ovariectomized rats (Albinus, Wistar) or sham (placebo) have been used. Fifty-two (52) implants had the surfaces coated with double acid-etched and MK-0822 at 0,06 mg/ml by the biomimetic method and 48 implants were installed on sham or ovariectomized rat tibias. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray dispersive energy (EDS) were performed in 4 implants after surface treatment for analysis of topography and chemical composition, in addition to performing contact angle analysis on 16 commercially pure titanium discs treated with the same surfaces. At 15 and 40 days after implant installation, microcomputer tomography was performed. Quantitative data was evaluated by adopting the significance level of $p < 0.05$. Besides the favorable topographic results to MK-0822 coated implants group, the microtomographic results presents statistically significant differences between the SHAM and OVX groups at most of the parameters ($p < 0,05$). Nevertheless, the MK-0822 coated group presents similar or higher values, although without statistic differences related to the control group in all parameters (TV, BV, BV/TV, Tb.Sp and Tb.N).

Keywords: Surface Properties. Bone Density Conservation Agents. Dental Implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental do estudo.....	19
Figura 2 -	Análise do ângulo de contato para avaliação da molhabilidade.....	20
Figura 3 -	Procedimento cirúrgico: ovariectomia.....	21
Figura 4 -	Ciclo estral.....	22
Figura 5 -	Procedimento cirúrgico para instalação dos implantes.....	23
Figura 6 -	Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície experimental duplo ataque ácido (controle) e odanacatib (teste).....	25
Figura 7 -	Energia Dispersiva de Raios-X da superfície tratada por duplo ataque ácido.....	26
Figura 8 -	Energia Dispersiva de Raios-X da superfície tratada por duplo ataque ácido.....	26
Figura 9 -	Ilustração do ângulo de contato.....	27
Figura 10 -	Obtenção do ângulo de contato.....	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise de molhabilidade.....	28
Gráfico 2 -	Parâmetro TV.....	29
Gráfico 3 -	Parâmetro Tb.Th.....	29
Gráfico 4 -	Parâmetro BV.....	30
Gráfico 5 -	Parâmetro BVTv.....	31
Gráfico 6 -	Parâmetro Tb.N.....	32
Gráfico 7 -	Parâmetro Tb.Sp.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Parâmetro TV.....	29
Quadro 2 -	Parâmetro Tb.Th.....	29
Quadro 3 -	Parâmetro BV.....	30
Quadro 4 -	Parâmetro BVTv.....	31
Quadro 5 -	Parâmetro Tb.N.....	32
Quadro 6 -	Parâmetro Tb.Sp.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise estatística da avaliação do ângulo de contato.....	28
Tabela 2 -	Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico BV.....	30
Tabela 3 -	Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico BV/TV.....	31
Tabela 4 -	Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.N.....	32
Tabela 5 -	Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.Sp.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
Au	Ouro
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaP	Fosfato de Cálcio
Catkl	Protease de cisteína lisossomal catepsina K
Cl	Cloro
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Ctan	CTAnalyser
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
ESL	Esclerodermia localizada
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg/Kg	Miligrama por quilo
Mg/Kg/dia	Miligrama por quilo por dia
Mg/L	Miligrama por Litro
Micro-ct	Microtomografia computadorizada
ml	Mililitros
ml/Kg	Mililitros por quilo
mm	Milímetro
N.cm	Newton por centímetro
Na	Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OCG	Grupo Controle OVX
OOG	Grupo Odanacatib OVX
OVX	Ovariectomizada
p	Nível de significância
P	Fósforo

pH	Potencial hidrogeniônico
ROI	Área ao redor do implante
SCG	Grupo Controle SHAM
SFC	Solução de fluido corpóreo
SHAM	Cirurgia fictícia de ovariectomia
SOG	Grupo Odanacatib SHAM
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Espessura do trabeculado ósseo
Ti	Titânio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Desenho do estudo	18
3.1.1	Estudo <i>in vitro</i>	18
3.1.2	Estudo topográfico e <i>in vivo</i>	18
3.2	Experimentação <i>in vitro</i>	19
3.2.1	Medida do ângulo de contato	19
3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	20
3.3	Experimentação <i>in vivo</i>	21
3.3.1	Procedimento cirúrgico	21
3.3.2	Microtomografia computadorizada (μ CT)	23
3.4	Análise Estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Análise Topográfica	25
4.2	Análise de ângulo de contato (molhabilidade)	27
4.3	Análise de Microtomografia Computadorizada	39
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXOS	43

1 INTRODUÇÃO*

Como resultado do progresso que tem sido feito com o desenvolvimento de implantes dentais, esses materiais estão disponíveis comercialmente em diferentes opções, de acordo com a geometria, tipo e características de superfície, (1) com nova pesquisa sobre alteração química ou micro morfologia do implante. (2) Diversas drogas vêm sendo estudadas ao longo do tempo, por sua capacidade de interferir no processo de osseointegração, o que pode ocorrer de forma sistêmica (3), ou ainda pela aplicação da medicação na superfície do implante para criar rugosidade, modificando sua topografia. (4)

Dentre essas drogas, os antirreabsortivos podem apresentar um efeito interessante no tecido ósseo ao redor do implante, melhorando a função de diferenciação dos osteoblastos e aumentando a apoptose dos osteoclastos. (5) As drogas possuem diferentes mecanismos de ação, podendo variar desde o bloqueio da reserva energética dos osteoclastos até a inibição de vias importantes para a ativação celular, levando à apoptose. (6)

Os estudos sobre o Odanacatib (MK-0822), que é um antirreabsortivo inibidor seletivo da catepsina K, iniciaram em 1995 na empresa Merck&Co(7), mostrando diminuição significativa dos marcadores ósseos de reabsorção (8), impedindo a degradação de proteínas da matriz, assim como o colágeno tipo I e aumentando a densidade mineral óssea. (9) Dessa forma, representa uma nova e importante terapia para doenças como perda óssea aguda induzida por metástase ou inflamatória. (8,9) Diferente de outros antirreabsortivos, a atividade osteoblástica se mantém intacta, mostrando-se eficaz na redução das fraturas vertebrais. (8,10)

A catepsina K é liberada não só pelos osteoclastos, como também em outros tecidos como coração e pulmões. (8) Isso faz com que efeitos adversos sejam observados durante sua administração sistêmica a longo-prazo como fraturas incomuns de fêmur, reações dermatológicas, risco de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. (8) Apesar dos fatores de risco, a droga apresenta uma boa tolerabilidade pelo organismo, quando administrada a longo-prazo. (11) Além disso, promove a osseointegração de implantes em ratas ovariectomizadas se administrado

* Normalizado de acordo com o periódico "The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants" – Anexo B

sistemicamente. (12)

Devido a esses efeitos colaterais, 16 anos após o início dos estudos do MK-0822, a empresa interrompeu o uso clínico da medicação(7), que está disponível para uso laboratorial. Este estudo foi desenvolvido a partir do conhecimento do mecanismo do MK-0822 no turnover ósseo e visa avaliar a incorporação de MK-0822 na superfície dos implantes, que serão instalados em ratas ovariectomizadas ou não, de modo que o seu efeito positivo seja evidenciado diretamente no leito receptor.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o processo de reparo e osseointegração ao redor de implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com superfície tratada através da deposição de MK-0822 pelo método biomimético em modelo padronizado de tíbias de ratas ovariectomizadas. As análises utilizadas foram a de topografia de superfície (Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios X), análise do ângulo de contato e microtomografia computadorizada.

Os objetivos específicos deste estudo envolvem a aplicação do antirreabsortivo MK-0822 em superfícies de implantes dentais como uma alternativa futura para a utilização em pacientes que possuam comorbidades sistêmicas como a osteopenia, e até mesmo a osteoporose. Além disso, a introdução de alternativas diferentes de superfícies no mercado pode favorecer o tratamento personalizado, mais indicado para cada paciente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-Unesp (Processo FOA nº 00494-2020) (Anexo A) e delineado de acordo com as diretrizes ARRIVE. (13) Quarenta e oito (48) implantes Ticp de 1,6mm de diâmetro e 3,0mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) tratados por duplo ataque ácido e MK-0288 (Odanacatib®, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) a 0,06 mg/ml através do método biomimético, foram utilizados. (14–18)

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Estudo topográfico

Foram utilizados 16 discos de Ticp de 0,5x03cm, sendo 8 discos para cada grupo na análise de ângulo de contato. Além disso, foram utilizados 4 implantes Ticp para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios X, sendo 2 implantes de cada superfície (duplo ataque ácido – CG e odanacatib – OG) (Figura 1).

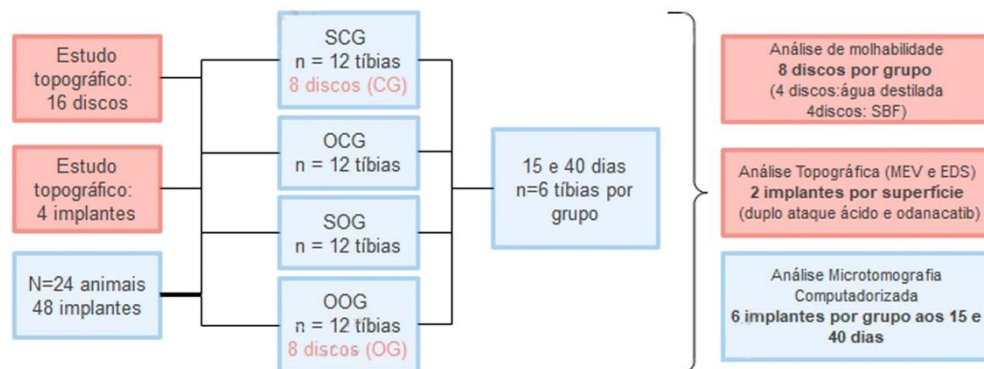
3.1.2 Estudo *in vivo*

Vinte e quatro (24) ratas Wistar foram utilizadas, 12 ratas submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) e 12 ovariectomizadas (OVX), com peso corporal entre 275 e 300g. O Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, Unesp forneceu todos os animais. O tamanho da amostra foi obtido pelo cálculo do poder do teste, utilizando o software G Power (19) (G*Power, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Alemanha), indicando 24 animais; com o poder do teste de 80% e nível de confiança de 95% (para realizar o cálculo, foi utilizado estudo piloto).

Os animais foram mantidos em gaiolas com quatro (04) animais em cada uma, em ambiente climatizado a uma temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos de claro e escuro de 12/12horas. (20) Os animais foram alimentados com ração sólida padrão e água “*ad Libitum*” durante todo o experimento. Foi realizada a verificação do ciclo estral dos

animais e apenas aqueles que apresentaram três ciclos regulares foram selecionados para o estudo. (21–23) Esses animais foram divididos em quatro grupos experimentais: duplo ataque ácido em ratas SHAM (**SCG**), duplo ataque ácido em ratas OVX (**OCG**), MK-0822 0,06 mg/ml em ratas SHAM (**SOG**), MK-0822 0,06 mg/ml em ratas OVX (**OOG**) (Figura 1). A concentração de MK-0288 foi determinada a partir de estudo prévio, que usou uma alta dosagem sistêmica de 30mg/kg em ratos. (12)

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor no software Wondershare EdrawMax (2023)

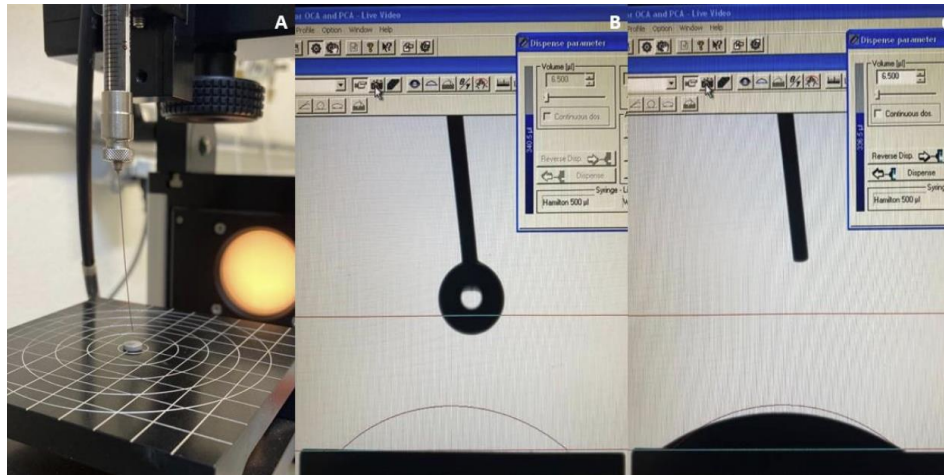
3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Medida do ângulo de contato

A medida do ângulo de contato da gota de um líquido de interesse numa superfície tem sido usada para caracterizar a sua molhabilidade. Oito discos de cada grupo experimental foram analisados quanto à interação de contato da superfície pelo método da gota séssim, utilizando como soluções testes: água destilada e SFC (24,25). A medida do ângulo de contato foi feita com auxílio do goniômetro (DAS 100 – Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha), o qual capturou a gota séssil das soluções nas superfícies. O parâmetro adotado para o dispenser foi com volume 6.500 µl (microlitros), uma taxa de 5.00 em 4 segundos após o contato. Os cálculos e demais

dados foram gerados pelo software (DSA4 – Krüss GmbH. Hamburgo, Alemanha) e pelo registro fotográfico, em que foi fornecido o valor médio do ângulo de contato (θ) das diferentes superfícies para cada solução experimental (Figura 2).

Figura 2 – Análise do ângulo de contato para avaliação da molhabilidade



A: Disco posicionado no goniômetro; **B:** Dispensa da solução sobre a superfície do disco; **C:** Após 4 segundos do primeiro contato com a gota.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

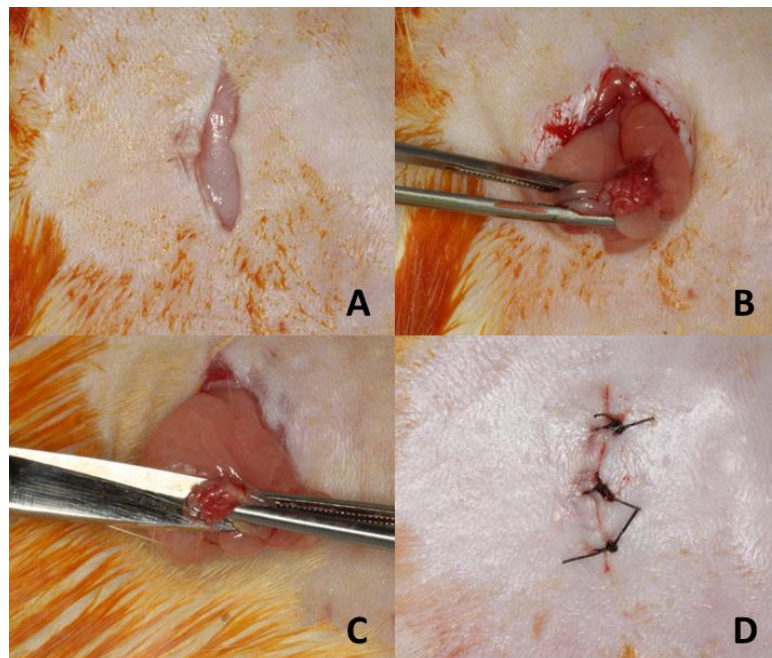
Dois implantes tratados de cada grupo (por duplo ataque ácido e MK-0288) foram analisados quanto à topografia por MEV (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) previamente à instalação nas tíbias de ratas. Finalmente, a espectrometria de energia dispersiva (EED) foi empregada para avaliar a formação da película de óxido e sua composição.

3.3. Experimentação *In vivo*

3.3.1. Procedimento Cirúrgico

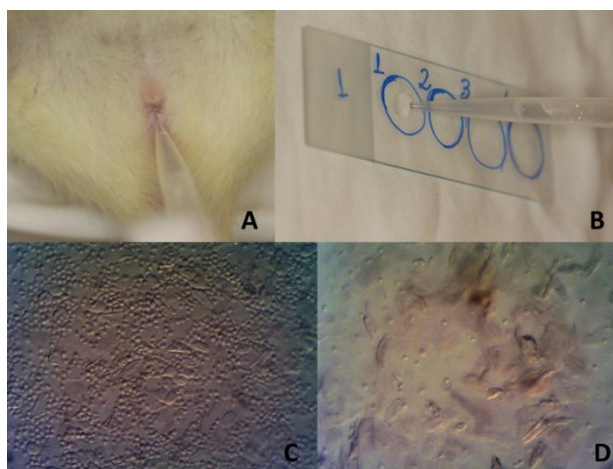
Para induzir osteopenia em parte dos animais, após 8 horas de jejum, 24 ratas SHAM e OVX foram submetidas ao procedimento cirúrgico (Figura 3) de acordo com Yogui et al. (26) Após 30 dias da ovariectomia e comprovação de sua funcionalidade através do ciclo estral (Figura 4), os implantes foram instalados.

Figura 3 – Procedimento cirúrgico: ovariectomia



A: Corte na parte lateral do abdômen, abaixo da costela; **B:** Após divulsão, exposição do ovário; **C:** Remoção do ovário (obs: nas ratas SHAM o ovário é apenas exposto e não removido); **D:** Sutura externa (de sutura por planos) com nylon 5-0.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

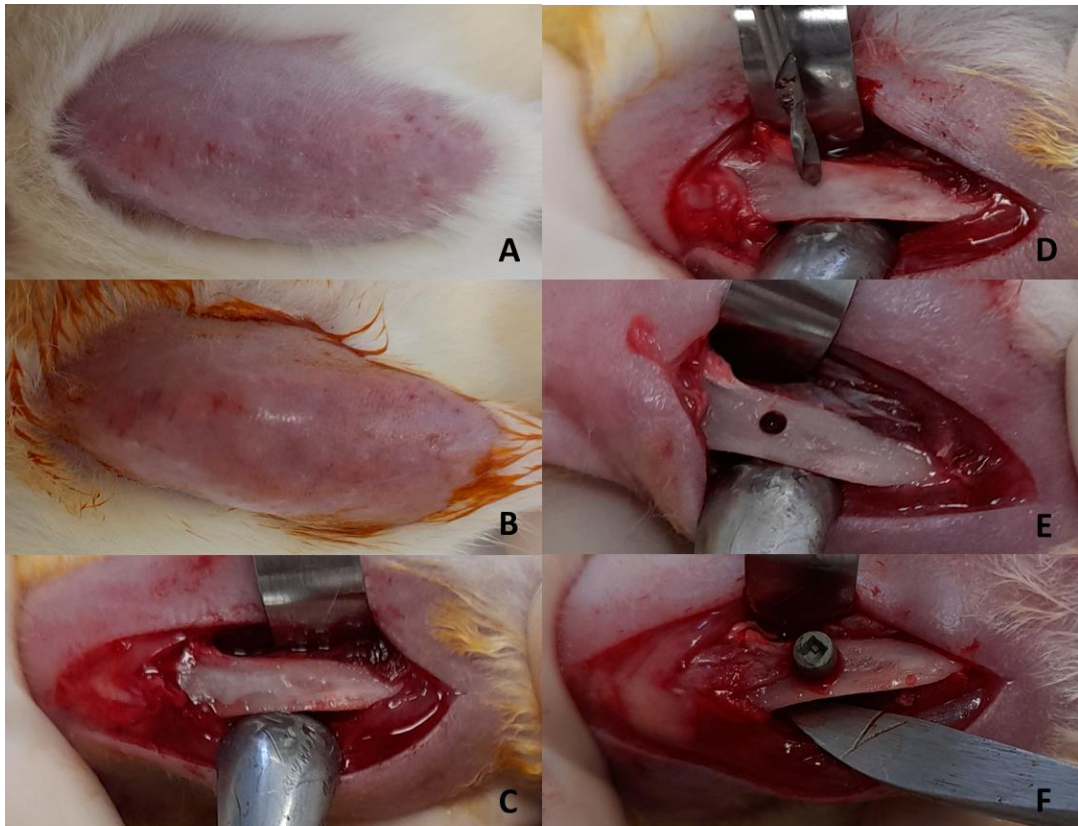
Figura 4 – Ciclo estral

A: Inserção e coleta de soro fisiológico na vagina do animal; **B:** Colocação do líquido coletado em uma lâmina histológica; **C:** exemplo da visualização microscópica no início e **D:** no final do ciclo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Foram administrados via intramuscular o Cloridrato de Ketamina a 1%, na dosagem de 50 mg/Kg, e o Cloridrato de Xilazina a 2%, 5 mg/Kg (Vetaset® –Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil); e infiltração local com Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na metáfise tibial. Incisão na metáfise proximal foi realizada para exposição óssea (Figuras 5A e B) e osteotomia bicortical com fresa espiral de 1,6 mm de diâmetro montada em contra-ângulo, acoplado a motor elétrico (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a 1500 rpm, sob irrigação com soro fisiológico a 0,9% (Figuras 5C e D). Os implantes foram instalados bilateralmente, com estabilização bicortical (Figuras 5E, F e G). As suturas foram realizadas com fios reabsorvíveis de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). Foi administrado via intramuscular o Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em única dose e três doses de morfina (Dimorf®, Itapira, São Paulo, Brasil) de 24 em 24 horas, a uma concentração de 2,5 mg/kg. Aos 15 e 40 dias, foi realizada a eutanásia por dose excessiva de Tiopental (150mg/kg, Thiopentax, Itapira, São Paulo, Brasil) associado a lidocaína (4mg/kg, Xylestesin®, Itapira, São Paulo, Brasil).

Figura 5 – Procedimento cirúrgico para instalação dos implantes



A: Tricotomia; **B:** Antissepsia; **C:** Incisão na metáfise tibial e exposição da tíbia; **D:** Fresagem inicial com fresa lança para posterior fresagem com fresa helicoidal; **E:** Tíbia fresada; **F:** Instalação bicortical do implante.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

3.3.2 Micro Tomografia Computadorizada (μ CT)

Os espécimes de 24 animais foram fixados em formol tamponado a 10%, por 48 horas, lavados em água corrente por 24 horas e conservados em álcool 70%. As amostras de cada grupo (SCG, OCG, SOG, OOG) foram escaneadas utilizando o microtomógrafo SCANCO μ CT 50 (SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) com 90kVp, 88 μ A, filtro de cobre de 0,1mm e FOV de 20.48 mm realizando 1000 projeções/180° expostas por 1s, averaging de 1 e reconstruídas em uma resolução isotrópica de 10 μ m.

As imagens foram avaliadas usando o software Fiji.(27) A resolução das imagens foi diminuída em 25% da original e uma seleção em círculo foi desenhada no espaço trabecular diretamente distal ao disco de crescimento entre a área intercondilar anterior e a posterior. As imagens foram rodadas para que os centros de ambos os círculos ficassem alinhados ao longo do eixo Z e a linha alinhada com o eixo Y. A medida da região foi realizada 2,5 mm ao longo do eixo Z, 1 mm distal do ponto onde a epífise adjacente à placa de crescimento primeiro se funde entre as protuberâncias mais altas da metáfise. A parede cortical interna foi desenhada utilizando a ferramenta de seleção “polígono” ao menos em 4 posições dos cortes, com no máximo 20 cortes entre as seleções, e foram interpoladas. A acurácia da interpolação foi checada e seleções intermediárias foram desenhadas quando necessário.

A transformação medida foi aplicada à varredura de resolução total e a região de medição foi ampliada para a resolução total. Antes da mensuração, um gap de 150 μm adjacente ao osso cortical foi excluído. Usando a ferramenta “espessura local”, mapas de espessura de estruturas ósseas, os gaps entre o osso e os gaps entre estruturas ósseas esqueletizadas foram criadas. Usando esses mapas, foram analisados os dados de volume ósseo total (TV), volume ósseo segmentado (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N) das duas apresentações.

3.4 Análise Estatística

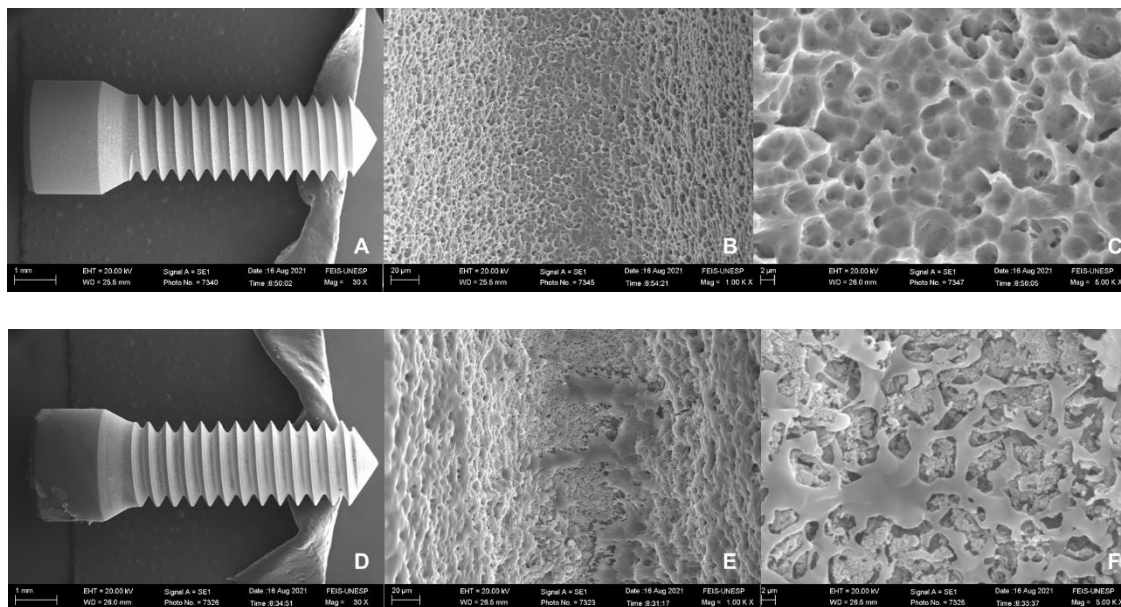
Os testes estatísticos foram conduzidos por meio do software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, United States), no qual os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) 2 fatores, com pós-teste Tukey para os valores de ângulo de contato, adotando nível de significância de 95% ($p < 0.05$). Da mesma forma, os dados da análise microtomográfica foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) 3 fatores, com pós-teste Tukey, com nível de significância de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Topográfica

Durante a microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível observar que ambas as superfícies em um aumento de 30x apresentaram-se muito semelhantes: aparentemente porosas (Figuras 6A e D). Porém, ao observar-se o aumento de 1.00Kx, a superfície submetida ao duplo ataque ácido (CG) apresenta superfície irregular e homogênea (Figura 6B), com porosidades de aproximadamente 2 μ m de diâmetro, como mostra também o aumento de 5.00Kx (Figura 6C). Diferente do grupo controle (CG), a superfície tratada com MK-0822 se apresentou porosa no aumento de 1.00Kx, com algumas formações mais homogêneas e globulares (Figura 6E). Em maior aumento (5.00Kx) foi possível observar essas formações dispostas entre as porosidades, criando uma morfologia 3D complexa e visualmente mais irregular, apesar da homogeneidade das formações globulares, que nesse aumento, apresenta ramificações que se interligam, em aspecto de rede (Figura 6F).

Figura 6 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície experimental duplo ataque ácido (controle) e odanacatib (teste)



A: Superfície tratada por duplo ataque ácido (CG) em aumento de 30x; **B:** CG em aumento de 1.00K; **C:** CG em aumento de 5.00K; **D:** Superfície tratada por deposição de odanacatib (OG) em aumento de 30x; **E:** OG em aumento de 1.00K; **F:** OG em aumento de 5.00K.

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philipis XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

Na análise de energia dispersiva de raios-x (EDS) observou-se que o implante tratado por duplo ataque ácido era composto 100% de Titânio (Ti) apenas (Figura 7).

Figura 7 – Energia Dispersiva de Raios-X da superfície tratada por duplo ataque ácido



Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

Enquanto o implante tratado por deposição de MK-0822 apresentou apenas 64,99% de Titânio (Ti); 11,64% de Oxigênio (O); 3,99% de Sódio (Na), além de outros componentes em menor porcentagem (Figura 8).

Figura 8 – Energia Dispersiva de Raios-X da superfície tratada por duplo ataque ácido

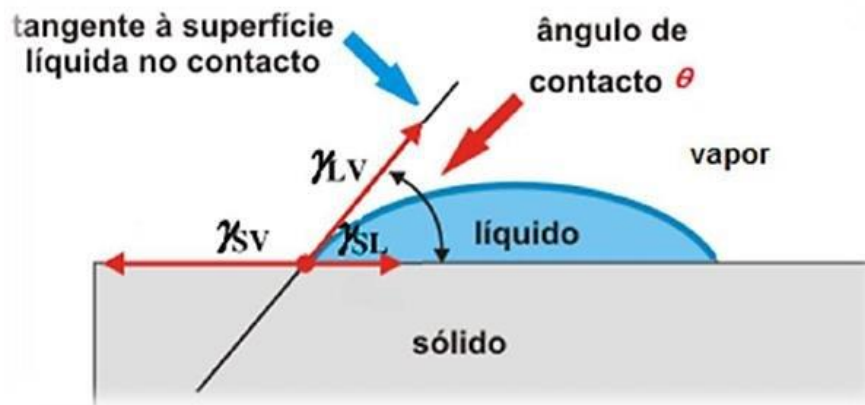


Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2021)

4.2 Análise de ângulo de contato (molhabilidade)

A superfície experimental do GC apresentou perfil hidrofílico apenas na solução de água destilada, conferindo um ângulo inferior a 90° entre um plano tangente à gota do líquido testado e a superfície do disco (Figura 9).

Figura 9 – Ilustração do ângulo de contato



Fonte: Cappelari E, Giordani C, Dapper STH, Masuero AB. Influência da resistência à compressão na molhabilidade superficial de concretos. *Matéria*. 2020; 25:e–12579.

Já quando testado com o líquido SFC, o GC apresentou um ângulo superior a 90° , mostrando menor interação da solução com a superfície. Enquanto isso, a superfície do GO apresentou ângulo de contato inferior a 90° para ambas as soluções testadas (água destilada e SFC), conferindo maior molhabilidade à superfície. (Figura 11)

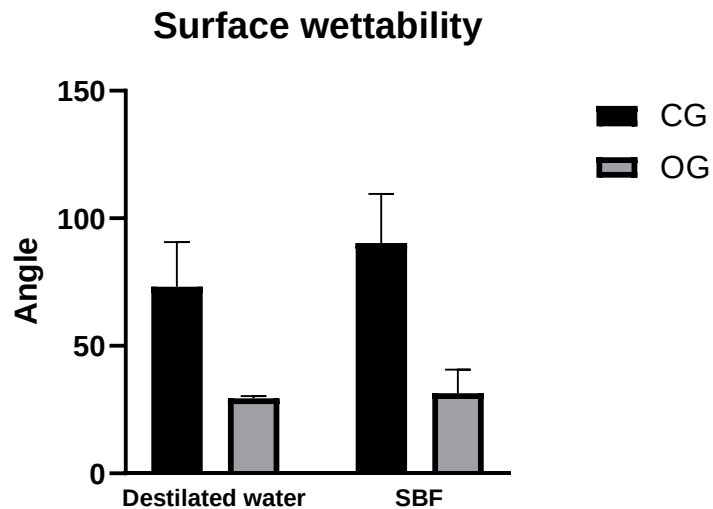
Figura 10 – Obtenção do ângulo de contato



Fonte: Tensiômetro óptico de ângulo de contato (2021)

Na comparação intergrupos, essa diferença é comprovada pela diferença estatisticamente significativa entre GC e GO para a solução de água destilada ($p=0,0007$) e para SFC ($p=0,0007$). (Gráfico 1) (Tabela 1)

Gráfico 1 – Análise de molhabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Tabela 1 – Análise estatística da avaliação do ângulo de contato

<i>Solutions</i>	CG	OG	<i>p value</i>
	<i>Mean±SD</i>	<i>Mean±SD</i>	
<i>Destilated water</i>	73.2±17.5 ^A	29.4±0.9 ^B	0.0007 ^{A,B*}
<i>SBF</i>	90.3±19.2 ^A	31.4±9.3 ^B	0.0007 ^{A,B*}

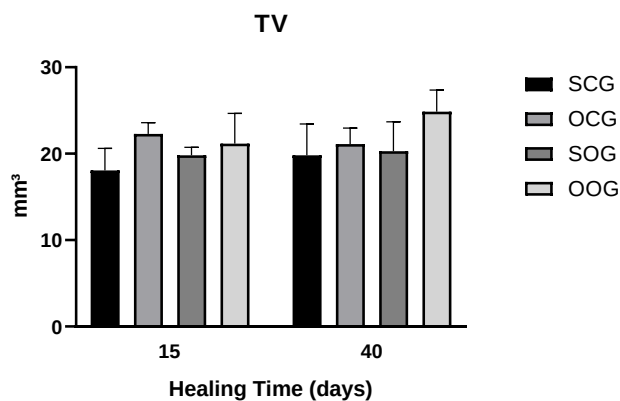
* Valor estatístico significativo ($p<0.05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). Mean = média; SD = desvio padrão; Destilated water = água destilada; SFC = SBF.

Fonte: Elaborada pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

4.3 Análise de Microtomografia Computadorizada

Na análise do parâmetro TV (volume de toda a região de interesse), medida em mm^3 , foi possível observar que a diferença tanto intergrupos quanto intragrupos e em relação aos períodos foi mínima, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) (Gráfico 2) (Quadro 1).

Gráfico 2 – Parâmetro TV



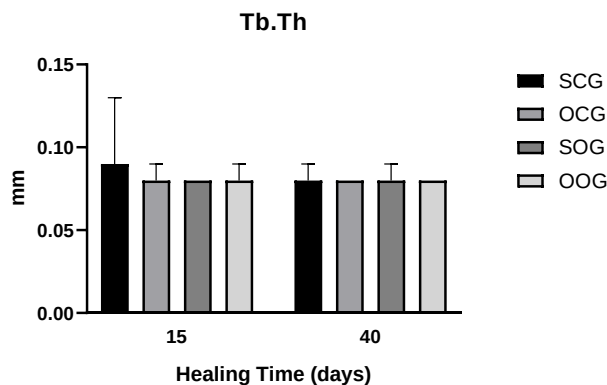
Quadro 1 – Parâmetro TV

TV (mm^3)		
Group	H.Time	Mean $\pm$ SD
SCG	15 days	18.07 $\pm$ 2.55
SCG	40 days	19.8 $\pm$ 3.63
OCG	15 days	22.29 $\pm$ 1.31
OCG	40 days	21.12 $\pm$ 1.83
SOG	15 days	19.81 $\pm$ 0.92
SOG	40 days	20.29 $\pm$ 3.40
OOG	15 days	21.17 $\pm$ 3.49
OOG	40 days	24.86 $\pm$ 2.50

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

O mesmo pôde ser observado para o parâmetro Tb.Th ($p>0.05$), que avalia a espessura média das trabéculas (Gráfico 3) (Quadro 2).

Gráfico 3 – Parâmetro Tb.Th



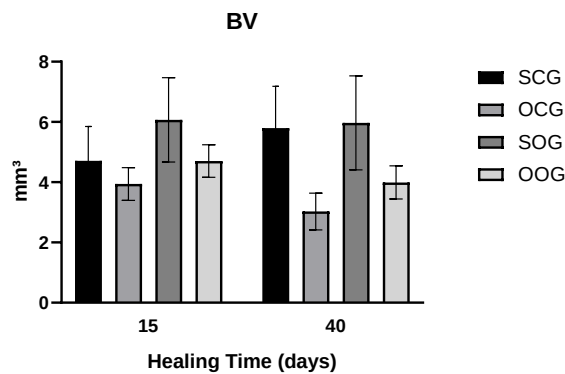
Quadro 2 – Parâmetro Tb.Th

Tb.Th (mm)		
Group	H.Time	Mean $\pm$ SD
SCG	15 days	0.09 $\pm$ 0.04
SCG	40 days	0.08 $\pm$ 0.01
OCG	15 days	0.08 $\pm$ 0.01
OCG	40 days	0.08 $\pm$ 0.00
SOG	15 days	0.08 $\pm$ 0.00
SOG	40 days	0.08 $\pm$ 0.01
OOG	15 days	0.08 $\pm$ 0.01
OOG	40 days	0.08 $\pm$ 0.00

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Enquanto isso, ao analisar o parâmetro BV (volume da região segmentada como osso), medida em mm^3 , foi possível observar que na comparação intergrupos aos 15 dias, o grupo SOG apresentou volume estatisticamente maior quando comparado ao grupo OCG (Gráfico 4) (Quadro 3) (Tabela 2), com $p=0.0492$. Além disso, aos 40 dias observou-se maior volume de tecido ósseo na ROI no grupo SCG quando comparado ao OCG ($p=0.0037$), e maior volume ósseo do grupo OCG em relação ao grupo SOG ($p=0.0018$). (Gráfico 4) (Quadro 3) (Tabela 2).

Gráfico 4 – Parâmetro BV



Quadro 3 – Parâmetro BV

BV (mm^3)		
Group	H.Time	Mean±SD
SCG	15 days	4.71±1.14
SCG	40 days	5.8±1.38
OCG	15 days	3.94±0.54
OCG	40 days	3.03±0.61
SOG	15 days	6.07±1.40
SOG	40 days	5.97±1.56
OOG	15 days	4.70±0.54
OOG	40 days	3.99±0.55

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2023)

Tabela 2 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico BV

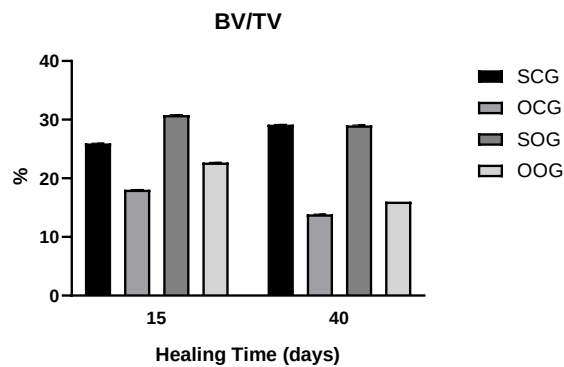
Healing Time (days)	SCG	OCG	SOG	OOG	p value
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
15	4.71±1.14	3.94±0.54 ^A	6.07±1.40 ^B	4.70±0.54	0.0492 ^{A,B*}
40	5.8±1.38 ^A	3.03±0.61 ^B	5.97±1.56 ^C	3.99±0.55	0.0037 ^{A,B*} 0.0018 ^{B,C*}

* Valor estatístico significativo ($p<0.05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). Mean = média; SD = desvio padrão; Healing time: período de eutanásia.

Fonte: Elaborada pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Ao analisar o parâmetro BV/TV (razão do volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse), foi possível observar diferença estatisticamente significativa tanto inter quanto intragrupos, e quando comparado ao tempo de eutanásia. A razão se apresentou maior no grupo SCG aos 15 dias do que quando comparada ao grupo OCG aos 15 ($p=0.0023$) e 40 dias ($p=0.0007$), sendo este de menor valor também quando comparado ao grupo OOG aos 15 dias ($p=0.0269$). Além disso, o grupo SOG aos 15 dias apresentou superioridade quantitativa ao grupo OOG aos 40 dias ($p<0.0001$) (Gráfico 5) (Quadro 4) (Tabela 3).

Gráfico 5 – Parâmetro BV/TV



Quadro 4 – Parâmetro BV/TV

BV/TV (%)		
Group	H.Time	Mean±SD
SCG	15 days	25.95±0.04
SCG	40 days	29.16±0.03
OCG	15 days	18.05±0.03
OCG	40 days	13.84±0.03
SOG	15 days	30.77±0.07
SOG	40 days	29.03±0.04
OOG	15 days	22.69±0.04
OOG	40 days	16.02±0.01

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2023)

Tabela 3 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico BV/TV

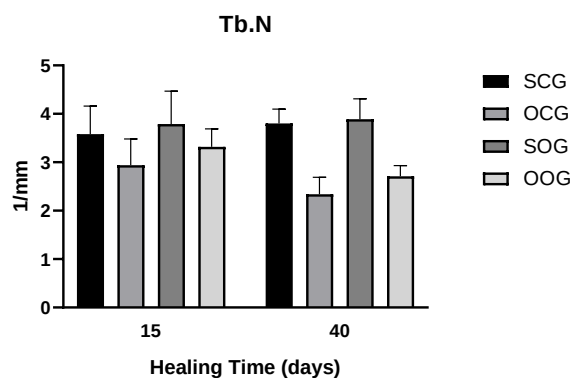
Healing Time (days)	SCG Mean±SD	OCG Mean±SD	SOG Mean±SD	OOG Mean±SD	p value
15	25.95±0.04 ^a	18.05±0.03 ^c	30.77±0.07 ^e	22.69±0.04 ^g	0.0007 ^{a,b} 0.0023 ^{c,d} <0.0001 ^{e,f} 0.0269 ^{g,b}
40	29.16±0.03 ^{A,d}	13.84±0.03 ^{B,b}	29.03±0.04 ^C	16.02±0.01 ^{D,f}	<0.0001 ^{A,B} 0.0002 ^{A,D} <0.0001 ^{B,C} 0.0002 ^{C,D}

* Valor estatístico significativo ($p<0.05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). Mean = média; SD = desvio padrão; Healing time: período de eutanásia.

Fonte: Elaborada pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

Ao avaliar o parâmetro Tb.N, o qual avalia o número médio de trabéculas formadas por unidade de comprimento, observou-se diferença estatisticamente significativa tanto na comparação inter como intragrupos, e em relação aos períodos de eutanásia. O grupo OOG aos 15 dias apresentou menor número de trabéculas quando comparado ao grupo SOG aos 15 ($p=0.0123$) e 40 dias ($p=0.0046$). Além disso, o grupo OOG aos 15 dias foi superior estatisticamente ao grupo OCG aos 40 dias ($p=0.0315$). Aos 40 dias, o grupo SCG mostrou maior número de trabéculas em relação aos grupos OCG ($p=0.0003$) e OOG ($p=0.0113$) (Gráfico 6) (Quadro 5) (Tabela 4).

Gráfico 6 – Parâmetro Tb.N



Quadro 5 – Parâmetro Tb.N

Tb.N (1/mm)		
Group	H.Time	Mean±SD
SCG	15 days	3.58±0.58
SCG	40 days	3.8±0.30
OCG	15 days	2.94±0.54
OCG	40 days	2.34±0.35
SOG	15 days	3.79±0.68
SOG	40 days	3.89±0.42
OOG	15 days	3.32±0.37
OOG	40 days	2.71±0.22

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2023)

Tabela 4 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.N

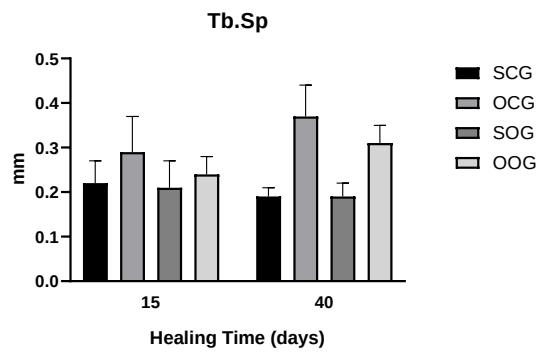
Healing Time (days)	SCG Mean±SD	OCG Mean±SD	SOG Mean±SD	OOG Mean±SD	p value
15	3.58±0.58	2.94±0.54	3.79±0.68 ^a	3.32±0.37 ^c	0.0123 ^{a,b} 0.0315 ^{c,d}
40	3.80±0.30 ^A	2.34±0.35 ^{B,d}	3.89±0.42 ^C	2.71±0.22 ^{D,b}	0.0003 ^{A,B} 0.0113 ^{A,D} 0.0046 ^{C,D}

* Valor estatístico significativo ($p<0.05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). Mean = média; SD = desvio padrão; Healing time: período de eutanásia.

Fonte: Elaborada pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

O parâmetro Tb.Sp, que avalia a distância média entre as trabéculas em milímetros, apresentou diferença estatisticamente significativa tanto na comparação inter quanto intragrupos, e em relação aos períodos de eutanásia. O grupo OCG aos 40 dias mostrou maior distância entre as trabéculas quando comparado ao grupo SCG ($p=0.0008$) e OOG ($p=0.0034$), aos 15 dias. Aos 40 dias, o grupo SCG mostrou menor distância entre as trabéculas quando comparado ao grupo OCG ($p<0.0001$) e ao grupo OOG ($p=0.0238$). Ainda aos 40 dias, o grupo SOG mostrou menor separação das trabéculas em relação aos grupos OCG ($p<0.0001$) e OOG ($p=0.0185$) (Gráfico 7) (Quadro 6) (Tabela 5).

Gráfico 7 – Parâmetro Tb.Sp



Quadro 6 – Parâmetro Tb.Sp

Tb.Sp (mm)		
Group	H.Time	Mean±SD
SCG	15 days	0.22±0.05
SCG	40 days	0.19±0.02
OCG	15 days	0.29±0.08
OCG	40 days	0.37±0.07
SOG	15 days	0.21±0.06
SOG	40 days	0.19±0.03
OOG	15 days	0.24±0.04
OOG	40 days	0.31±0.04

Fonte: Elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2023)

Tabela 5 – Análise estatística da avaliação do parâmetro microtomográfico Tb.Sp

Healing Time (days)	SCG	OCG	SOG	OOG	p value
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
15	0.22±0.05 ^a	0.29±0.08	0.21±0.06	0.24±0.04 ^c	0.0008 ^{a,b} 0.0034 ^{b,c}
40	0.19±0.02 ^A	0.37±0.07 ^{B,b}	0.19±0.03 ^C	0.31±0.04 ^D	<0.0001 ^{A,B} 0.0238 ^{A,D} <0.0001 ^{B,C} 0.0185 ^{C,D}

* Valor estatístico significativo ($p<0.05$ pelo teste ANOVA TWO WAY). Mean = média; SD = desvio padrão; Healing time: período de eutanásia.

Fonte: Elaborada pelo autor no software GraphPad Prism 8.0.1 (2022)

5 DISCUSSÃO

Apesar do alto risco ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio, o MK-0822 tem ação na redução em marcadores bioquímicos de reabsorção óssea e aumento da densidade mineral óssea, diminuindo o risco de fraturas(29), como já dito anteriormente. O que levou os autores a investigarem a ação local da medicação, atualmente vendida apenas para uso laboratorial. Utilizando uma concentração de 0,06 mg/ml de MK-0822, os implantes foram tratados através do método biomimético.

Se tratando de um estudo que leva a situação clínica a uma condição crítica de qualidade óssea, a osteopenia, é possível observarmos a diferença estatisticamente significativa entre os grupos SCG e OCG e entre SOG e OOG, principalmente aos 40 dias, na maioria dos parâmetros (BV, BV/TV, Tb.N e Tb.Sp). Apenas o parâmetro BV que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos SOG e OOG. Porém, esse resultado mostra que a condição osteopênica realmente foi estabelecida, com um padrão de comparação real para o estudo.

Em relação à topografia de superfície, não foram encontrados estudos publicados que utilizassem o MK-0822 como tratamento de superfície de implantes dentais, sendo a primeira vez a ser relatada como porosa, com formações dispostas entre as porosidades, criando uma morfologia 3D complexa e visualmente irregular, com ramificações que se interligam, em aspecto de rede. É sabido que as modificações topográficas de uma superfície de implante visam aumentar a área de contato osso-implante através de sua rugosidade, favorecendo a retenção do coágulo sanguíneo, interferindo nas respostas celulares e estimulando a osseointegração.(30,31) Atualmente, existem estudos mais específicos em relação à rugosidade e ao tipo de colonização de células para a qualidade tecidual ao redor do implante.

Um desses estudos avaliou *in vitro* o padrão de rugosidade em formato de “favos de mel” reproduzida em titânio e colonizou essas estruturas com macrófagos da linhagem RAW 264.7. Foi encontrado através de que as estruturas com menor diâmetro dos favos (90 nm e 500nm) eram mais favoráveis à indução da ativação de macrófagos M2, que facilita o reparo tecidual pela produção de IL-4 e IL-10. Já a ativação de macrófagos M1 ocorreu em diâmetros aumentados (1000 nm e 5000 nm), facilitando o recrutamento de células reparativas, podendo levar à formação de tecido

fibrótico, desfavorecendo a osseointegração.(32)

Podemos observar que neste estudo a rugosidade dos implantes tratados por duplo ataque ácido possui um diâmetro em torno de $2\mu\text{m}$, enquanto a superfície dos implantes tratados por deposição de MK-0822 tem um padrão mais irregular, com diâmetros menores e maiores do que $2\mu\text{m}$. Esse padrão não regular pode interferir durante a proliferação celular, suspeitando-se da diminuição da quantidade de células que se aderem em algumas regiões, ou até mesmo em relação ao padrão celular que se prolifera na superfície do implante. Isso pode ocorrer pois a nano topografia permite uma maior adesão e proliferação celular quando comparado à micro topografia, porém ainda não existe embasamento científico clínico para a superfície nano topográfica.(33)

A microtopografia de superfície, aliada à molhabilidade e à composição físico-química do implante com superfície tratada pode modular a resposta biológica e a adesão celular, através de aspectos como a adesão de proteínas e macromoléculas à superfície; a interação de tecidos moles e duros com as superfícies; adesão bacteriana e formação de biofilme; e o nível de osseointegração.(33) A superfície é considerada mais hidrofílica quanto mais próximo de 0 for o ângulo entre a gota e a superfície, sendo em nosso estudo que a superfície tratada com MK-0822 apresentou valores menores do que 50° , se mostrando mais hidrofílica que a superfície controle ($> 50^\circ$) (Gráfico 1 e tabela 1).

Frente à hidrofiliabilidade das superfícies, a composição química da superfície também traz dados importantes para o comportamento biológico frente às vias da osteogênese. A análise de EDS mostrou que não houve contaminação dos implantes após o tratamento das superfícies, com 100% de titânio na superfície CG, enquanto a composição química da superfície de OG pelo método biomimético mostrou a presença dos elementos Ti, O, Na e, em menores porcentagens o Cl, P e Ca. É conhecido que o método biomimético por si só precipita os elementos Ca, Na, O e P, que realizam trocas iônicas entre si, permitindo a precipitação de um filme de hidroxiapatita. (17,34). Ainda não é conhecido o mecanismo de osseointegração a nível químico do MK-0822, mas neste estudo foi possível observar que a mudança nas concentrações dos elementos não prejudicou a resposta biológica.

Ao comparar os dados de topografia de superfície, que apresentou resultados

favoráveis à osteogênese, pode-se avaliar também os dados microtomográficos, permitindo essa correlação entre os resultados. Ao estudar os parâmetros microtomográficos, em um quadro favorável à microestrutura óssea, têm-se o aumento de BV, TV, BV.TV, Tb.Th e Tb.N, e a diminuição de Tb.Sp. No nosso estudo, não houve diferença estatística entre os grupos e entre os períodos para os parâmetros TV e Tb.Th, mostrando que a espessura das trabéculas e o volume total de osso não mudou significativamente. Ao contrário do Tb.N, que mostrou que o número de trabéculas é maior nos grupos SHAM e no grupo OVX com tratamento com MK-0822 aos 15 dias e no grupo SHAM tratado com MK-0822 aos 40 dias.

Além disso, é possível observar que os valores de BV evidenciam a influência sobre os valores de BV/TV, mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SCG e OCG e, SOG e OOG, principalmente aos 40 dias. A diferença entre os grupos evidencia que os grupos que foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) apresentaram resultados superiores, o que era de se esperar. Já a diferença entre os grupos OCG e OOG aos 40 dias não foi estatisticamente significativa, mostrando que o MK-0822 mostrou um resultado similar ao tratamento por duplo ataque ácido para BV/TV.

A literatura em relação ao efeito local do MK-0822 ainda é escassa, porém um estudo que avalia a osseointegração de implantes em fêmur de ratas em condições osteopênicas após a administração oral de MK-0822 em baixa (5mg/kg) e alta dose (30mg/kg) mostrou a eficácia da medicação para a melhora dos parâmetros ósseos nos animais. Entre eles, na análise de microtomografia computadorizada, BV/TV e a densidade mineral óssea (DMO), foram mais altas nas ratas OVX com alta dose de MK-0822 do que nas ratas OVX com veículo (placebo) administrado.(35)

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que comparam o tratamento de superfície com duplo ataque ácido e com MK-0822, apesar de os valores serem mais altos nos grupos com MK-0822 (SOG e OOG), em nenhum dos parâmetros. Porém, no parâmetro BV, foi possível observar diferença estatística entre os grupos OCG e SOG tanto aos 15 quanto aos 40 dias, o que dificulta a avaliação por parte dos autores quando avaliada isoladamente, pois existem duas variáveis envolvidas: OVX e o tratamento de superfície. Mesmo assim, os resultados apresentados pelo grupo tratado por MK-0822 foram muito semelhantes ao duplo ataque ácido, apresentando valores superiores em alguns casos. Isso mostra

que o comportamento dessa superfície em indivíduos osteopênicos foi muito satisfatório.

Esses dados forneceram informações de que o MK-0822 possui uma ação semelhante ao tratamento por duplo ataque ácido na maioria dos parâmetros microtomográficos, mesmo que as análises de topografia de superfície mostram sua superioridade em relação ao controle. Esse resultado também foi observado em um outro estudo do grupo, o qual avaliou as superfícies tratadas por duplo ataque ácido, por método biomimético apenas com o SBF e pela deposição de MK-0822 através do método biomimético em ratos. (36) Esse estudo abre brechas para novos estudos, que estão sendo realizados e poderão esclarecer possíveis dúvidas e lacunas que tenham se estabelecido.

6 CONCLUSÃO

As modificações de superfície propostas neste trabalho se mostraram eficazes para osseointegração de implantes, com superioridade em organismos normofisiológicos quando comparado aos osteopênicos, porém com alta eficácia do grupo tratado em ratas osteopênicas. Os resultados com o tratamento tópico de MK-0822 foram otimizados nas análises de topografia, ângulo de contato, com comportamento semelhante ao controle na microtomográfica, apresentando um aumento substancial dos 15 aos 40 dias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

REFERÊNCIAS

1. Rolim LA, Santos FCM dos, Chaves LL, Gonçalves MLCM, Freitas-Neto JL, Nascimento AL da S do, et al. Enhanced Reader.pdf. Vol. 388, Nature. 2020. p. 539–47.
2. Younis I, Gault D, Sabbagh W, Kang N V. Patient satisfaction and aesthetic outcomes after ear reconstruction with a Branemark-type, bone-anchored, ear prosthesis: A 16 year review. J Plast Reconstr Aesthetic Surg [Internet]. 2010;63(10):1650–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2009.10.004>
3. Apostu D, Lucaciu O, Lucaciu GDO, Crisan B, Crisan L, Baciut M, et al. Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration [Internet]. Vol. 49, Drug Metabolism Reviews. Taylor & Francis; 2017. 92–104 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03602532.2016.1277737>
4. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. Int J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 2015;44(6):798–805. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.02.018>
5. Clemett D, CM S. Raloxifene. xPharm Compr Pharmacol Ref. 2009;60(2):1–6.
6. Anesi A, Generali L, Sandoni L, Pozzi S, Grande A. From osteoclast differentiation to osteonecrosis of the jaw: Molecular and clinical insights. Int J Mol Sci. 2019;20(19).
7. Mullard A. Merck &Co. drops osteoporosis drug odanacatib. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2016;15(10):669. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.207>
8. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: Biology, potential clinical utility, and lessons learned. Endocr Rev. 2017;38(4):325–50.
9. Cabal A, Williams DS, Jayakar RY, Zhang J, Sardesai S, Duong LT. Long-term treatment with odanacatib maintains normal trabecular biomechanical properties in ovariectomized adult monkeys as demonstrated by micro-CT-

- based finite element analysis. *Bone Reports* [Internet]. 2017;6:26–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bonr.2017.01.001>
10. Bone HG, Dempster DW, Eisman JA, Greenspan SL, McClung MR, Nakamura T, et al. Erratum to: Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the Long-Term Odanacatib Fracture Trial (Osteoporosis International, 10.1007/s00198-014-2944-6). *Osteoporos Int*. 2015;26(11):2721.
 11. Rizzoli R, Benhamou CL, Halse J, Miller PD, Reid IR, Rodríguez Portales JA, et al. Continuous treatment with odanacatib for up to 8 years in postmenopausal women with low bone mineral density: a phase 2 study. *Osteoporos Int* [Internet]. 2016;27(6):2099–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-016-3503-0>
 12. Yi C, Hao KY, Ma T, Lin Y, Ge XY, Zhang Y. Inhibition of cathepsin K promotes osseointegration of titanium implants in ovariectomised rats. *Sci Rep*. 2017;7:1–11.
 13. du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020;18(7):1–12.
 14. Harmankaya N, Karlsson J, Palmquist A, Halvarsson M, Igawa K, Andersson M, et al. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(6):7064–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.040>
 15. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907–15.
 16. Aparecida AH, Fook MVL, Guastaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(6):1215–22.
 17. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. *Biomechanical and*

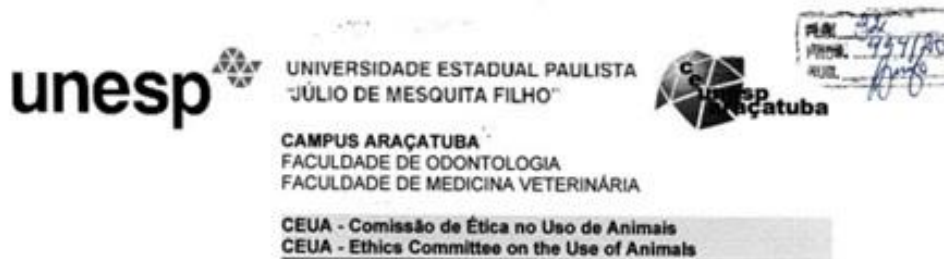
- topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(8):896–903.
18. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, Nishioka RS, et al. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2013;101 B(1):76–84.
 19. Erdfelder E, FAul F, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009;41(4):1149–60.
 20. Gao X, Ma W, Dong H, Yong Z, Su R. Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):5123–8.
 21. Gizzo S, Saccardi C, Patrelli TS, Berretta R, Capobianco G, Gangi S Di, et al. Update on raloxifene: Mechanism of action, clinical efficacy, adverse effects, and contraindications. *Obstet Gynecol Surv.* 2013;68(6):467–81.
 22. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone [Internet].* 2010;46(4):1021–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2009.12.016>
 23. LUVIZUTO ER, QUEIROZ TP, DIAS SMD, OKAMOTO T, DORNELLES RCM, GARCIA IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):52–9.
 24. Bruzzone AAG, Costa HL, Lonardo PM, Lucca DA. Advances in engineered surfaces for functional performance. *CIRP Ann - Manuf Technol.* 2008;57(2):750–69.
 25. Bracco G, Holst B. Surface science techniques. Vol. 51, Springer Series in Surface Sciences. 2013.
 26. Yogui FC, Momesso GAC, Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G,

- Hassumi JS, et al. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. *J Appl Oral Sci.* 2018;26(18):1–13.
27. Schindelin J, Arganda-Carrera I, Frise E, Verena K, Mark L, Tobias P, et al. Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat Methods.* 2009;9(7).
 28. Buxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468–86.
 29. Stone JA, McCrea JB, Witter R, Zajic S, Stoch SA. Clinical and translational pharmacology of the cathepsin K inhibitor odanacatib studied for osteoporosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85(6):1072–83.
 30. Cooper LF. 522 THE JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. 84(5).
 31. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NHJ. Implant surface roughness and bone healing: A systematic review. *J Dent Res.* 2006;85(6):496–500.
 32. Zhu Y, Liang H, Liu X, Wu J, Yang C, Wong TM, et al. Regulation of macrophage polarization through surface topography design to facilitate implant-to-bone osteointegration. *Sci Adv.* 2021;7(14):1–14.
 33. Cruz MB, Silva N, Marques JF, Mata A, Silva FS, Caramês J. Biomimetic Implant Surfaces and Their Role in Biological Integration—A Concise Review. *Biomimetics.* 2022;7(2).
 34. Ahn TK, Lee DH, Kim T sup, Jang G chol, Choi SJ, Oh JB, et al. Modification of Titanium Implant and Titanium Dioxide for Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1077:355–68.
 35. Yi C, Hao KY, Ma T, Lin Y, Ge XY, Zhang Y. Inhibition of cathepsin K promotes osseointegration of titanium implants in ovariectomised rats. *Sci Rep [Internet].* 2017;7:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44682>

36. Sanches N dos S. Araçatuba 2023. Dissertação. 2023;

ANEXOS

Anexo A – Comitê de Ética no Uso Animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com odanacatib e raloxifeno em ratas ovariectomizadas. Estudo experimental in vitro e in vivo**", Processo FOA nº 00494-2020, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de Dezembro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Maio de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Junho de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the bone response of a raloxifene and odanacatib coated implant surface in ovariectomized rats. In vitro and in vivo experimental study**", Protocol FOA nº 00494-2020, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 30, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 30, 2022.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
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

Anexo B – Normas para publicação *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*



GUIDELINES FOR AUTHORS

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi
Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. *No paper version is required.*

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial board.)

Review/editing of manuscripts

Manuscripts will be reviewed by the editor-in-chief and will be subjected to blind review by the appropriate associate editor and reviewers with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES

All biomechanics (FE) articles and technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See <http://www.icmje.org>

• **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

• **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.

• **Abstract/key words.** The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.

• **Article text.** Currently there is no article page limit (within reason).

• **Acknowledgments.** Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.

• **Legends.** Figure legends should be typed as group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.

• **Tables.** Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.

• **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

• **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.

• **Numbers.** Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

• All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
• The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
• Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
• Avoid using abstracts as references.
• Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525–531.

Book reference style:

1. Wikesjö UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:269–286.

ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (on disk) to:

Managing Editor
International Journal of Oral and Maxillofacial Implants
Quintessence Publishing Co, Inc
4350 Chandler Drive
Hanover Park, IL 60133

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.