



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

STÉFANY BARBOSA

**Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e
miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via
oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo
ósseo em ratos diabéticos**

**Araçatuba
2023**

STÉFANY BARBOSA

**Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e
miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via
oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo
ósseo em ratos diabéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Associado Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B238a Barbosa, Stéfany.
Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos / Stéfany Barbosa. – Araçatuba, 2023
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Regeneração óssea 2. Implantes dentários 3. Materiais biocompatíveis I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Aos meus pais, Maria Estela Bertechini Barbosa e
Fidelcino Barbosa que sempre me apoiaram em
todas as minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me permitir concluir mais essa fase da minha vida acadêmica.

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

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) (Processo nº 2021/04001-8) pelo auxílio no formato de bolsa de pós-graduação.

Aos **meus pais** que sempre me apoiam em todas as minhas escolhas, que sempre entendem os momentos de ausência e que fazem o possível e impossível para me ver realizar os meus sonhos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**, por confiar no meu trabalho e estar sempre disponível para me ajudar. Sou muito grata de aprender todos os dias com você e pela amizade que estamos cultivando.

Aos professores da pós-graduação, que sempre estão ao nosso lado nos enchendo de conhecimento. Em especial, a **Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, que tenho como exemplo de sabedoria, de cuidado com os pacientes e de profissional e ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, que participou ativamente do desenvolvimento desse trabalho e pelo qual tenho um grande carinho.

Aos colegas da pós-graduação, em especial as minhas amigas **Mirela Caroline Silva, Ana Maira Pereira Baggio e Stefani Ferrioli**, que foram minhas parceiras desses dois anos e me garantiram vários momentos felizes.

Ao meu companheiro **Vitor Henrique Alves da Cruz**, que foi minha força em muitos momentos difíceis e que sempre está torcendo pela minha felicidade e sucesso. Amo você.

Ao colega **Raphael Cavalcante Costa** e ao **Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão**, por todo o auxílio neste trabalho, da idealização até o seu desenvolvimento. Sou muito grata a vocês.

A **todos os funcionários da FOA-UNESP** que trabalham com muito carinho para que a faculdade funcione perfeitamente.

Aos **animais**, por doarem sua vida em prol a ciência e permitirem assim, melhorar condições de saúde a várias pessoas.

BARBOSA, S. **Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos**. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Diante dos efeitos promissores do biovidro no reparo ósseo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade osteoindutora do revestimento vidro bioativo sintetizado via oxidação por plasma eletrolítico na neoformação óssea de ratos diabéticos. Para isso, implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) foram revestidos por PEO-BG (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; m/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, ciclo de trabalho de 10%, 420 s). Inicialmente, caracterizações de superfície foram conduzidas para confirmar a topografia (Microscopia Confocal de Varredura à Laser – CLSM), composição química (Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS) e propriedades físico-químicas (Perfilometria e Molhabilidade) das amostras. Em seguida, o estudo *in vivo* foi conduzido utilizando ratos Wistar (n = 27) e um protocolo de indução da diabetes mellitus pela administração de estreptozotocina (35mg/kg) foi empregado. Após 30 dias, os animais foram aleatoriamente distribuídos para passar por cirurgia de instalação de implantes osseointegráveis ou para confecção de fraturas femorais seguida da fixação com miniplacas do sistema 1.5mm. Os grupos experimentais consistiram em: Implante com superfície comercialmente disponível de jateamento de zircônia seguida de duplo ataque ácido (grupo **ZrAC**) e implante tratado por PEO-BG (grupo **PEO-BG/Implante**) e para as placas, foram utilizadas placas convencionalmente comercializadas, com superfície apenas usinada (grupo **CONV**) e placas tratadas por PEO-BG (Grupo **PEO-BG/Placa**). Nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos a eutanásia e processamento laboratorial para análise histométrica e imunoistoquímica (BMP-2, OPG, RANKL e OCN), considerando o nível de significância de $p < 0,05$ para a análise estatística. As caracterizações topográficas demonstraram que o revestimento PEO-BG foi reproduzido com sucesso, ocorrendo a efetiva incorporação dos elementos do biovidro, além de formação de uma superfície com inúmeras rugosidades, alta molhabilidade e maior área de superfície disponível. Com relação aos resultados, faz-se necessário esclarecer que em decorrência da condição de diabetes mellitus ao qual

todos os animais foram submetidos, houve uma alta incidência de infecção nos locais cirúrgicos nos períodos pós-operatórios, mesmo sem ocorrer deiscência de sutura e presença de contaminantes externos, com isso, as amostras de placas foram fortemente afetadas pela infecção e não apresentaram reparo tecidual. Dessa forma, não foi possível considerar tais amostras na análise e, portanto, os pontos positivos aqui elencados fazem referência apenas as amostras do estudo desenvolvido com implantes. A redução da densidade óssea mineral em decorrência da Diabetes experimentalmente induzida foi comprovada a partir da análise biomecânica, onde os animais diabéticos apresentaram valores de rigidez e de força máxima significativamente menores que os animais saudáveis ($p < 0,05$). Os resultados referentes aos implantes demonstraram maior área de osso neoformado e maior área de contato osso-implante para o grupo PEO-BG em ambos os períodos pós-operatórios (14 e 28 dias) ($p < 0,05$), com perfil inflamatório compatível com as fases do reparo tecidual. As expressões de BMP-2, RANKL, OPG e OCN corroboraram com os resultados de formação óssea e reforçaram o entendimento de que PEO-BG otimizou o reparo ósseo periimplantar. Dessa forma, o revestimento de PEO-BG apresentou efetivamente uma atividade osteoindutora e atuou melhorando as condições de reparo ósseo periimplantar, o que por sua vez tem grande potencial para favorecer a osseointegração dos implantes.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Implantes dentários. Materiais biocompatíveis.

BARBOSA, S. Evaluation of the osteoinductive potential of implants and miniplates coated with bioactive glass via electrolytic plasma oxidation in optimizing bone repair in diabetic rats. 2023. 59 f. Dissertation (Master's) – Faculty of Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Given the promising effects of bioglass on bone repair, this study aimed to evaluate the osteoinductive potential of the PEO-BG coating synthesized via oxidation by electrolytic plasma on new bone formation in diabetic rats. For this, implants of commercially pure titanium (TiCP) were coated with PEO-BG (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; m/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, duty cycle of 10 %, 420 sec). Initially, surface characterizations were conducted to confirm the topography (Confocal Laser Scanning Microscopy – CLSM), chemical composition (Energy Dispersive Spectroscopy – EDS) and physical-chemical properties (Prophylometry and Wettability) of the samples. Then, the in vivo study was conducted using Wistar rats (n = 27) and a protocol of induction of diabetes mellitus by administering streptozotocin (35mg/kg) was applied. After 30 days, the animals were randomly assigned to undergo surgery to implants placement or create femoral fractures, followed by fixation with miniplates of the 1.5mm system. The experimental groups were: Implant with commercially available surface of zirconia blasting followed by double acid etching (ZrAC group) and implant treated with PEO-BG (PEO-BG/Implant group) and for the plates, conventionally commercialized plates were used, with only machined surface (CONV group) and PEO-BG treated surface (PEO-BG/Board group). At 14 and 28 postoperative days, the animals were euthanized and the samples were lab processing for histometric and immunohistochemical (BMP-2, OPG, RANKL, and OCN) analysis, considering the level of significance of $p < 0.05$ for the statistical analysis. The topographical characterizations demonstrated that the PEO-BG coating was successfully reproduced, with the effective incorporation of the bioglass elements, in addition to the formation of a surface with numerous roughness, high wettability and greater available surface area. Regarding the results, it is necessary to clarify that due to the condition of diabetes mellitus to which all the animals were submitted, there was a high incidence of infection in the surgical sites in the postoperative periods, even without suture dehiscence and the presence of external contaminants. Therefore, the plate samples were strongly affected by the infection and did not show tissue repair.

Thus, it was not possible to consider such samples in the analysis and the positive points listed here refer only to samples from the study developed with implants. The decreasing in mineral bone density as a result of experimentally induced diabetes was proven from the biomechanical analysis, where diabetic animals had lower values of stiffness and maximum strength significantly compared to healthy animals ($P < 0.05$). The implants data showed a greater newly formed bone and bone-implant contact for the PEO-BG group in both postoperative periods (14 and 28 days) ($P < 0.05$), with an inflammatory profile compatible with the stages of tissue repair. BMP-2, RANKL, OPG and OCN immunolabeling corroborated the bone formation results and reinforced the understanding that PEO-BG optimized peri-implant bone repair. Microtomographic analysis demonstrated a significantly superior bone volume and percentage pattern for PEO-BG, as well as superior bone quality parameters. Thus, the PEO-BG coating effectively presented an osteoinductive activity and acted to improve the conditions of peri-implant bone repair, which it has great potential to favor the osseointegration of implants.

Keywords: Bone regeneration. Dental implants. Biocompatible materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração macroscópica (A) e microscópica (B) da ação do perfilômetro durante a análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo	20
Figura 2 - Goniômetro utilizado para as análises de molhabilidade e energia livre de superfície (A), sendo demonstrado a ponteira responsável pela aplicação da gota na superfície do disco testado (B) e a imagem capturada pelo programa após a mensuração dos ângulos formados (C).....	20
Figura 3 - Representação clínica do procedimento de aplicação de estreptozotocina via veia peniana.....	22
Figura 4 -Imagem representativa do posicionamento da amostra óssea e da célula de carga utilizada para aplicação de força vertical	23
Figura 5 - Figura 5 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial. (B) Exposição da musculatura sobreposta a metáfise tibial. (C) Metáfise tibial exposta. (D) Preparo do leito ósseo. (E) Instalação dos implantes com rosqueamento digital (demonstrado com implante do grupo ZrAC). (F) Representação do posicionamento final do implante bicorticalizado (demonstrado com implante do grupo PEO-BG).....	25
Figura 6 - Etapas para confecção de fraturas femorais, osteossíntese com instalação de miniplacas . (A) Realização de incisão na porção lateral do fêmur. (B) Localização da divisão anatômica entre os músculos lateral e bíceps do fêmur, servindo como referência para divulsão tecidual. (C) Fêmur exposto após divulsão. (D) Perfuração para instalação de parafusos. (E) Placa fixada com 4 parafusos bicorticais. (F) Simulação da fratura com disco circular. (G) Aspecto final da fratura. (H) Sutura – realizada por planos	26
Figura 7 - Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das três superfícies utilizadas no estudo. (A) Imagens bidimensionais da análise de CLSM em magnitude de 20x. (B) Imagens tridimensionais de CLSM em magnitude de 50x. (C) Mapa de cores da proporção atômica dos componentes presentes na superfície. (D) Valores de rugosidade dos grupos experimentais. (E) Representação gráfica dos valores de ângulo de contato com a água.....	32
Figura 8 - Imagens gráficas referentes aos resultados da análise biomecânica de caracterização do tecido ósseo dos animais diabéticos em comparação com animais	

saudáveis, através da utilização de tíbias e fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures. (B) Resultado de rigidez das tíbias. (C) Força máxima para os fêmures. (D) Força máxima para as tíbias. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*)	33
Figura 9 - Imagens referentes a análise histológica das amostras de implantes instalados em tíbias. (A) Fotomicrografias representativas em magnitudes de 10x, 40x e 100x, respectivamente. (B) Valores de área de osso neoformado para os grupos experimentais. (C) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (D) Representação gráfica de contagem de vasos sanguíneos.....	35
Figura 10 - Figuras representativas da análise imunoistoquímica. (A) Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcção das respectivas proteínas. (B) Valores de imunomarcção de BMP-2. (C) Valores de imunomarcção de OPG. (D) Valores de imunomarcção de RANKL. (E) Valores de imunomarcção de OCN.....	36
Figura 11 - Imagens referentes a análise microtomográfica. (A) Representação tridimensional da área óssea ao redor do implante. (B) Representação gráfica dos valores de volume ósseo (BV). (C) Representação gráfica da porcentagem de volume ósseo (BV/TV). (D) Representação gráfica dos valores de espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th). (E) Representação gráfica de separação das trabéculas ósseas. (F) Representação gráfica do número de trabéculas (Tb.N).....	38
Figura 12 - Representação da análise histológica para miniplacas de titânio. (A) e (B) Fotomicrografias representativas da análise das placas nas magnitudes de 4x, 10x, 40x e 100x, sendo possível verificar regiões de maiores infiltrados inflamatórios, regiões de necrose tecidual e ausência de reparo ósseo. (B) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (C) Representação gráfica da quantidade de vasos sanguíneos.....	40
Figura 13 - Figuras representativas da análise imunoistoquímica. (A) Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcção das respectivas proteínas. (B) Valores de imunomarcção de BMP-2. (C) Valores de imunomarcção de OPG. (D) Valores de imunomarcção de RANKL. (E) Valores de imunomarcção de OCN.....	41
Figura 14 - Imagem tridimensional representativa do aspecto observado nas amostras de fêmures para os grupos CONV e PEO-BG, obtido através da microtomografia computadorizada.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP-2	Proteína óssea morfogenética recombinante humana do tipo 2
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLSM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D
CONV	Superfície usinada comercialmente disponível
cpTi	Superfície de titânio comercialmente puro
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteopontina
PEO	Revestimento de superfície por oxidação por plasma eletrolítico
PEO-BG	Revestimento de superfície à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico
RANKL	Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B ligante
ZrAC	Superfície comercialmente disponível de jateamento de zircônia e duplo ataque ácido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Texturização de superfície das amostras	18
3.1.1 Revestimento à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico ...	18
3.2 Caracterizações de superfície.....	19
3.2.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM).....	19
3.2.2 Perfilometria (rugosidade de superfície).....	19
3.2.3 Molhabilidade e energia livre de superfície	20
3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva.....	21
3.3 Desenho experimental do modelo animal	21
3.3.1 Indução de diabetes mellitus em ratos Wistar	22
3.3.1.1 Análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos)	23
3.3.2 Cirurgia de instalação de implantes em tíbia.....	24
3.3.3 Cirurgia de confecção de fraturas femorais e osteossíntese com instalação de miniplacas	25
3.4 Suspensão pela cauda	27
3.5 Métodos de análise.....	28
4 ANÁLISE DE TECIDOS DESCALCIFICADOS.....	28
4.1 Análise histológica	28
4.2 Análise Imunoistoquímica.....	29
5 ANÁLISE DE TECIDOS CALCIFICADOS	30
5.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	30
6 RESULTADOS	32
6.1 Caracterização topográfica	32
6.1.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM).....	32
6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	32
6.1.3 Rugosidade de superfície.....	33
6.1.4 Ângulo de contato – água.....	33
6.2 Estudo in vivo	34
6.2.1 Análise comprobatória de redução da DMO – Biomecânica	34
6.3 – Estudo de osseointegração – IMPLANTES.....	35
6.3.1 Análise histológica.....	35

6.3.2 Análise imunoistoquímica.....	37
6.3.3 Análise microtomográfica	38
6.4 Estudo de reparo ósseo – PLACAS	40
6.4.1 Análise histológica.....	40
6.4.2 Análise imunoistoquímica.....	41
6.4.3 Análise microtomográfica	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um procedimento complexo que demanda de interações celulares, disponibilidade de citocinas, matriz osteocondutora e de um bom suprimento vascular para que ocorra adequadamente (1). Nesse contexto, implantodontistas e cirurgiões bucomaxilofaciais podem encontrar dificuldades em reabilitações orais e no tratamento de fraturas (2–4). Similarmente, os médicos ortopedistas também compartilham este desafio terapêutico, especialmente em situações de pacientes politraumatizados, em que condições inerentes ao trauma como magnitude, direção e tipo de força aplicada podem ter implicações diretas no prognóstico (1,5). A somatória de todos esses fatores aumenta as chances de perda de implantes, infecção pós-fixação de fraturas e má consolidação óssea. Além da elevação dos custos dos procedimentos, aumento do tempo de internação e maior morbidade ao paciente (6–9).

Na literatura, também é bem estabelecido que alguns fatores locais do hospedeiro podem interferir diretamente na qualidade do tratamento como a qualidade óssea, localização anatômica, presença de infecções locais e até mesmo a influência de alguns protocolos terapêuticos sistêmicos, como as medicações antirreabsortivas (10–12). Além destes fatores, é importante destacar que alterações sistêmicas como a diabetes mellitus, artrite reumatoide, desnutrição, anemia, hipovitaminoses, osteopenia, osteoporose e anemia podem influenciar negativamente no reparo ósseo (12–14).

Dentre as condições sistêmicas mencionadas, a diabetes mellitus é uma doença que afeta o metabolismo ósseo diretamente, modificando a expressão gênica associada à atividade dos osteoblastos e inibindo a maturação e metabolismo de células tronco mesenquimais. Em adição, a diabetes ocasiona uma redução nos níveis de Vitamina D e consequente aumento na liberação de Paratormônio (PTH), o que estimula a atividade osteoclastogênica e aumenta o risco de fraturas (15–17). Consequentemente, o paciente com diabetes apresenta uma inflamação tecidual crônica e dificuldade de cicatrização generalizada, apresentando uma qualidade óssea ruim e baixa renovação do tecido ósseo. Desta forma, a diabetes é uma condição desafiadora para a instalação de implantes osseointegráveis e fixação de fraturas com miniplacas/placas (12,18,19).

Para tentar superar este problema e aumentar a sobrevida dos tratamentos, estratégias terapêuticas visando aprimorar o processo de reparação óssea em pacientes portadores de diabetes mellitus vem sendo amplamente investigado na área biomédica. Dentre as possíveis estratégias, os revestimentos de superfície têm sido amplamente investigados em diferentes sistemas de implantes e componentes protéticos e, recentemente, também em miniplacas de Ti (20). De maneira geral, os revestimentos de superfícies são produzidos por diferentes métodos de síntese, demonstrando comportamento ósseo superior *in vitro*, quando comparado com superfícies usinadas (sem tratamento) (21–23). Estes achados são atribuídos as melhores propriedades mecânicas, físico-químicas e resistência à corrosão, sendo importantes características quando se visa a neoformação óssea em condições desafiadoras como no cenário da diabetes (22,24,25).

Dentre as inúmeras técnicas de revestimento existentes, a oxidação por plasma eletrolítico (PEO) (26,27) tem sido empregada pelo nosso grupo (20,28–30) e por outros (31–33), como uma via para aumentar o potencial de osseointegração de dispositivos biomédicos implantáveis. Conceitualmente, o PEO é um método simples de processos eletroquímicos de oxidação que permite a formação de topografias complexas (em escala μm), modificando as propriedades superfícies do material (rugosidade, molhabilidade, energia livre de superfície e/ou camada de óxido). Em termos de reparo ósseo, estudos *in vitro* têm evidenciado que a complexa topografia dos revestimentos de PEO proporcionam uma maior área de superfície de contato, consequentemente, favorecem uma melhor interação de proteínas e células humanas com a superfície experimental (34,35). Este mecanismo foi também testado *in vivo*, demonstrando que superfícies tratadas com PEO, de fato, aumentam a área de contato entre osso/implante, acelerando o reparo tecidual e promovendo uma maior área de osso neoformado em fraturas femorais, quando comparado a superfícies comercialmente disponíveis (20,28,30). Ainda, o PEO é um método eficiente para incorporar também elementos bioativos visando potencializar os efeitos benéficos obtidos por meio das modificações de superfície.

Nesta perspectiva, o estudo prévio de Costa et al. (2020) desenvolveu e caracterizou, pela primeira vez na literatura, um revestimento para implantes dentários bioinspirado na composição do biovidro 45S5-bioglass®. Esse revestimento (PEO-BG) foi produzido por PEO sobre a superfície de discos de Ti utilizando agentes

precursores do 45S5-bioglass® em solução eletrolítica (SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5). O PEO-BG mostrou ser altamente aderente ao substrato, com alta resistência à corrosão e ao desgaste tribológico, importantes características anteriormente não atingidas por outros métodos de deposição. Além disso, PEO-BG apresenta biocompatibilidade com células humanas e mecanismos biológicos *in vitro* semelhantes ao 45S5-bioglass®. Em síntese, os efeitos biológicos são baseados na lixiviação de íons bioativos (Si, Ca, P e Na) do PEO-BG, que leva ao aumento do pH do meio e, consequentemente, a precipitação mais rápida de uma camada de apatita e a maior adsorção de proteínas do plasma sanguíneo. Portanto, o PEO-BG possui características positivas e superiores para osseointegração e neoformação óssea (36), quando comparado com superfícies controle: maquinada ou comercial (jateamento de alumínio seguido de ataque ácido; SLA).

Assim, tendo em vista os excelentes resultados encontrados *in vitro*, para confirmar que a superfície PEO-BG desenvolvida é promissora para aplicações biomédicas, é de suma importância avaliar o desempenho deste revestimento em modelos animais capazes de captar todo o espectro de interações com o hospedeiro e comprovar a possível estimulação de células osteogênicas para a produção de matriz óssea *in vivo*. Além disso, foi hipotetizado (36) que o PEO-BG poderia promover habilidades osteoindutivas e osteocondutivas devido ao mecanismo de liberação iônica, o que ainda não havia sido estudado considerando amostras de implantes dentários e miniplacas em situações críticas de reparo ósseo, como o que foi simulado pelo uso de modelo animal diabético como desenvolvido neste estudo.

2 OBJETIVOS

O presente teve como objetivo geral avaliar a capacidade osteoindutora de implantes e miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos. Os objetivos específicos desse estudo foram:

- 1) Sintetizar revestimentos de PEO-BG em implantes e miniplacas de Tícp por meio do PEO;
- 2) Caracterizar as superfícies experimentais em termos de morfologia, topografia, composição química e propriedades físico-químicas;
- 3) Avaliar *in vivo* o efeito modulatório da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro na presença do revestimento PEO-BG em tecidos descalcificados;
- 4) Investigar *in vivo* o potencial de osseointegração dos tecidos calcificados na presença de implantes e miniplacas revestidas com PEO-BG.

A hipótese nula desta pesquisa é que o tipo de texturização não influenciará nos parâmetros reparacionais a serem analisados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, 18 implantes de titânio comercialmente puro, grau 4, foram fornecidos pela empresa DSP (DSP Biomedical, Ouro Verde II, Campo Largo – PR) com superfície tratada por jateamento com zircônia e duplo ataque ácido, de modo comercialmente disponível e seguindo os parâmetros da empresa e representando a superfície denominada de **ZrAC**. Além disso, a mesma empresa, forneceu 18 implantes de superfície lisa, ou seja, sem nenhum tipo de texturização, a qual foi encaminhada para receber o revestimento à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico (**PEO-BG/Implante**).

Com relação as miniplacas, a empresa Traumec (Traumec Health Technology-Distrito Industrial, Rio Claro – SP) forneceu no total 30 miniplacas de titânio comercialmente puro, grau 4, de modo que 15 foram mantidas sem nenhum tratamento, para representar o grupo controle usinado convencionalmente disponível (**CONV/Placa**), enquanto o restante, foram revestidas por meio da técnica de PEO-BG (**PEO-BG/Placa**).

Para o estudo em modelo animal, 27 ratos Wistar foram induzidos a uma condição de diabetes mellitus e realizada cirurgias de instalação de implantes em tíbia e confecção de fraturas e osteossíntese com miniplacas em fêmures. A escolha de diferentes sítios cirúrgicos foi baseada na microarquitetura óssea dos respectivos ossos longos em animais, onde sabe-se que a tíbia é, no rato, o osso que mais se assemelha as características do osso alveolar humano(37).

Além disso, a escolha do fêmur para reparo após simulação de fratura, pois se sabe que diante de condições sistêmicas que culminam em redução de densidade mineral óssea, esse osso, assim como no fêmur humano, é o que mais apresenta repercussões e limitações do reparo (37).

A determinação da utilização de grupo controle ou teste foi realizada de forma aleatória, por meio do website <https://www.random.org/>, tanto para a instalação de implantes quanto para osteossíntese. Neste momento o operador não pôde ser cego devido a topografia visualmente diferente entre os grupos controle e experimental, entretanto, todas as análises foram realizadas por um pesquisador cego (38).

O número de amostras por grupo foi determinado através da ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data

Analysis, San Jose, California, USA) considerando resultados de desfecho primário em artigos prévios e com metodologia semelhante, desse modo, para determinação da amostra para instalação de implantes, foi utilizada uma diferença entre médias de 144,3, desvio padrão de 41.13 e poder estatístico de 95%, obtendo-se um $n=4$ tíbias (28). Para o cálculo amostral para osteossíntese, utilizou-se uma diferença de 0.11, desvio padrão de 0.02 e poder estatístico de 95%, obtendo-se $n= 4$ fêmures (29). Foi adicionada uma tíbia e um fêmur para os respectivos números amostrais, devido ao risco de perdas e complicações, o que é sustentado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo $n= 5$ para implantes e $n= 4$ para miniplacas, por agrupamento de análises (Grupo A – descalcificados e Grupo B- calcificados) e por tempo experimental (14 e 28 dias para grupo A e apenas 28 dias para grupo B), totalizando em 15 tíbias (ZrAc/Implante e PEO-BG/Implante) e 12 fêmures (CONV/Placa e PEO-BG/Placa).

3.1 Texturização de superfície das amostras

3.1.1 Revestimento à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico

Para a realização do revestimento de PEO-BG, as amostras (implantes e miniplacas) foram inicialmente limpas por ultrassom com água deionizada (10min), desengorduradas com propanol 70% (10min) e secas com ar quente (250°C). O tratamento por PEO foi realizado utilizando-se uma fonte de alimentação de corrente contínua (Plasma Technology Ltda.), o qual se encontra no Laboratório de Plasma Tecnológico da UNESP de Sorocaba sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz e em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Valentim Barão (UNICAMP), uma sólida e frutífera parceria previamente estabelecida. O tratamento foi realizado com a amostra (ânodo) imerso em uma solução eletrolítica no interior de um reservatório de aço inoxidável (cátodo) com sistema de refrigeração que manteve a temperatura da solução eletrolítica em aproximadamente 20 °C. O suporte da amostra foi projetado para permitir a exposição completa do implante/miniplaca ao eletrólito.

A solução eletrolítica foi preparada utilizando metassilicato de sódio 0,014 M ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; pureza: 98,0%), acetato de cálcio 0,20 M ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca}$; pureza: 99,5%), nitrato de sódio 0,50 M (NaNO_3 ; pureza: 99,5%), e glicerolfosfato de sódio

0,0010 M ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$; pureza: 99,0%) como fontes precursoras para os principais elementos bioativos do 45S5-bioglass. Além disso, 0,025 M $\text{Na}_2\text{-EDTA } 2\text{H}_2\text{O}$ (pureza: 98,0%) foi usado como agente quelante em todas as soluções eletrolíticas. Os parâmetros de trabalho da PEO foram: tensão anódica pulsada (500 V, 1000 Hz, ciclo de trabalho de 10%) por 420 s. Posteriormente, as amostras tratadas com PEO-BG foram enxaguadas em água destilada, secas ao ar e esterilizadas por autoclave 24 horas antes do procedimento cirúrgico.

3.2 Caracterizações de superfície

No período baseline, todas as superfícies passaram por avaliações da superfície como método de comprovação da reprodutividade da superfície experimental. Para tanto, na maioria das análises foram utilizados discos de titânio com superfície equivalente as utilizadas no estudo e em acordo com o trabalho realizado anteriormente in vitro, nas análises qualitativas foi utilizado um n=2 de cada grupo (ZrAC/Implante; PEO-BG/Implante; CONV/Placa e PEO-BG/Placa) e nas análises quantitativas um n=4, de modo que para todas as análises foram realizadas leituras em no mínimo 3 áreas distintas.

3.2.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

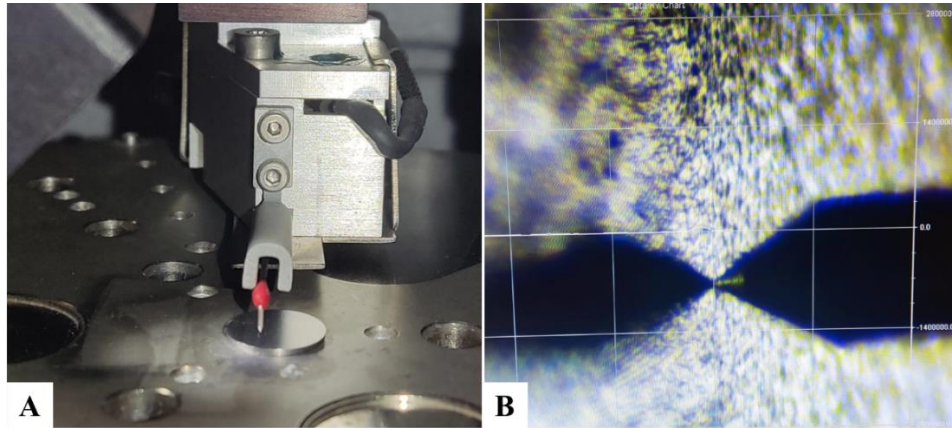
O microscópio confocal de varredura a laser 3D (CLSM, Keyence model VK-X200 series) foi utilizado para a obtenção de imagens bidimensionais e tridimensionais, de modo a possibilitar a caracterização qualitativa da topografia da superfície dos espécimes. Para isso, foi utilizada a ampliação de 50× e 150×. O processamento das imagens e mensuração da área de superfície foi realizado pelo software VK-Analyzer (Keyence v 3.3.0.0).

3.2.2 Perfilometria (rugosidade de superfície)

A rugosidade de superfície das amostras foi analisada por meio de um perfilômetro (Dektak 150-d; Veeco) (Figura 1). Os valores de R_a (média aritmética da

rugosidade de superfície) foram obtidos utilizando o cut-off de 0,25 mm a uma velocidade de 0,05 mm/s durante 12 s.

Figura 1 – Demonstração macroscópica (A) e microscópica (B) da ação do perfilômetro durante a análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo

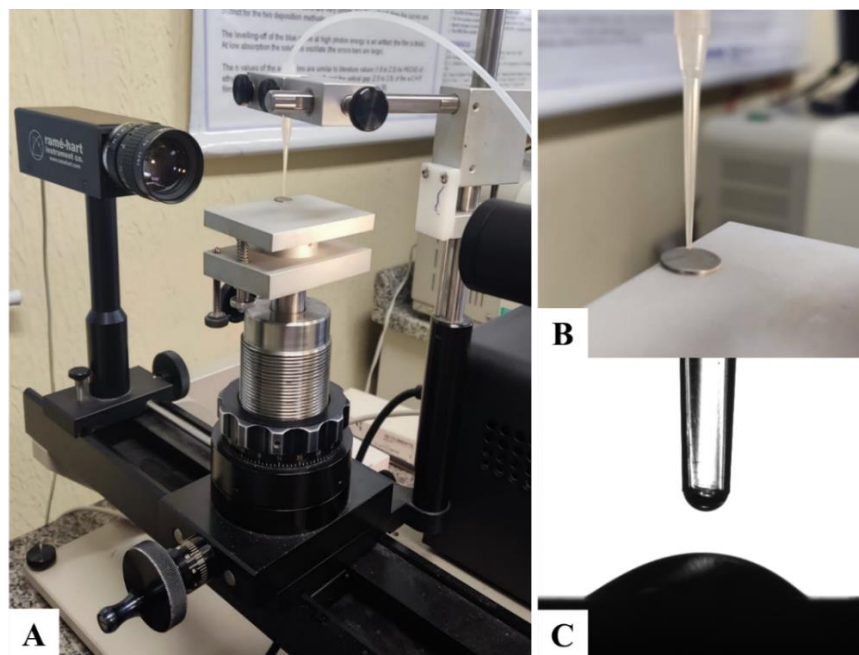


Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

3.2.3 Molhabilidade e energia livre de superfície

A energia livre de superfície foi calculada por meio de um goniômetro (Ramé-Hart 10000; Ramé-Hart Instrument Co) utilizando o método da gota sêssil (Figura 2). Os grupos foram avaliados quanto ao ângulo de contato com a água (componente polar).

Figura 2 – Goniômetro utilizado para as análises de molhabilidade e energia livre de superfície (A), sendo demonstrado a ponteira responsável pela aplicação da gota na superfície do disco testado (B) e a imagem capturada pelo programa após a mensuração dos ângulos formados (C)



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva

A análise pela espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada em pequenos volumes, na ordem de $1 \mu\text{m}^3$ (20). Mapas de cores foram utilizados para investigar a distribuição dos elementos químicos na superfície dos implantes e miniplacas e confirmar a proporção estequiométrica (% atômica) esperada (45% Si, 24.5% Ca, 24.5% Na, 6% P; 5:2:2:1 razão biológica).

3.3 Desenho experimental do modelo animal

Antes do início da proposta, o projeto foi enviado para avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e, após obter parecer favorável (Processo FOA nº 0298-2021) o trabalho teve início. Todos os procedimentos realizados seguem as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os guidelines previamente publicados no “Animal Arrive guidelines 2.0”.

Durante todo o experimento os ratos foram mantidos em gaiolas com no máximo 4 animais, 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) e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgico. Após o procedimento cirúrgico, os animais referentes ao estudo com miniplacas em fêmures foram suspensos pela cauda em gaiolas transparentes ficando um animal por gaiola, enquanto os animais que tiveram instalação de implantes retornaram para caixas com até 4 animais. Todas as outras condições de ambientação foram mantidas iguais entre todos os ratos.

Para este estudo foram utilizados 27 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), machos, adultos, com 6 meses de idade, e peso corporal variando de 250 a 300 gramas. Os animais foram fornecidos a partir de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, que por sua vez, foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

O número de amostras por grupo foi determinado através da ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0, como mencionado no início da metodologia, sendo 15 ratos destinados à instalação de implantes (15 tíbias para ZrAC/Implante e 15 para PEO-BG/Implante) e 12 ratos para osteossíntese com miniplacas (12 fêmures para CONV/Placa e 12 para PEO-BF/Placa).

3.3.1 Indução de diabetes mellitus em ratos Wistar

Para indução de diabetes mellitus, os ratos passaram, inicialmente, por um período de jejum durante a noite, com duração entre 14 e 16 horas e em seguida foram coletadas amostras de sangue pelo método da ponta da cauda e as concentrações de glicose no sangue em jejum foram medidas por um sistema automático de monitoramento de glicose no sangue (Accu-Check® Performa; Roche-Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, EUA). Em seguida, os animais foram anestesiados por uma combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Dopalen-Ceva Saúde Animal – Paulínia, São Paulo, Brazil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan – Ceva Saúde Animal – Paulínia, São Paulo, Brazil) e em seguida receberam uma injeção de solução contendo estreptozotocina (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, EUA) dissolvida em uma solução tampão de citrato a 35 mg / kg, na veia peniana (Figura 3). Seis dias após a indução do diabetes, amostras de sangue foram coletadas para determinar os níveis de glicose sanguínea de todos os animais

e os que apresentarem valores acima de 200mg/dL seguiram para as cirurgias de instalação de implantes e confecção de fraturas e osteossíntese. Durante 30 dias, foram realizadas aferições semanais da glicemia de todos os animais e somente após esse período foram realizadas as cirurgias de instalação de implantes em tíbia e confecção de fraturas femorais e osteossíntese com instalação de miniplacas.

Figura 3 – Representação clínica do procedimento de aplicação de estreptozotocina via veia peniana

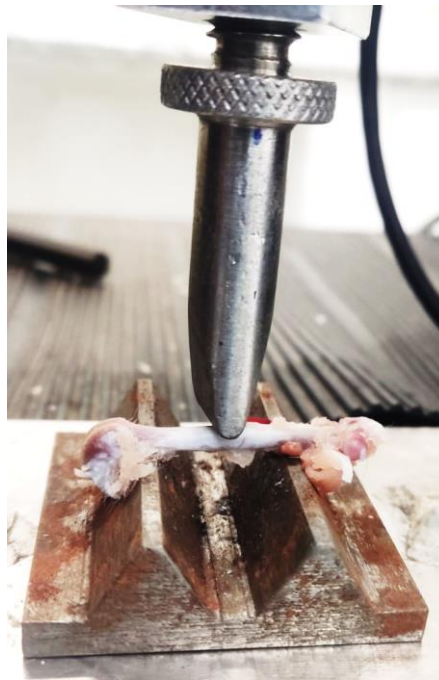


Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

3.3.1.1 Análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos)

Como análise auxiliar para comprovação de redução de densidade mineral óssea em decorrência da Diabetes Mellitus experimentalmente induzida, foi proposta a realização de análise biomecânica (Teste de Flexão de três pontos) (MZ-500S; Instrumento Maruto). Para isso, as tíbias e fêmures que não foram utilizadas para instalação de implantes e confecção de defeito e fixação com miniplacas, respectivamente, foram utilizadas. As amostras ósseas foram inicialmente posicionadas voltadas para cima em uma plataforma, apoiadas em dois suportes, um anterior e um posterior, permanecendo bem estabilizadas. Em seguida, uma força vertical foi aplicada na região central dos fêmures, com carga de 5mm/min, enquanto curvas de deformação e carga foram traçadas em gráficos com análise de rigidez e força máxima aplicada (Figura 4).

Figura 4 – Imagem representativa do posicionamento da amostra óssea e da célula de carga utilizada para aplicação de força vertical



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

3.3.2 Cirurgia de instalação de implantes em tíbia

No período de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à jejum, e posteriormente, foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina, em seguida, receberam cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/Kg, Mepiadre 2% 1:100.000® - Nova DFL, Taquara, Rio de Janeiro, Brasil) como anestesia local e para hemostasia.

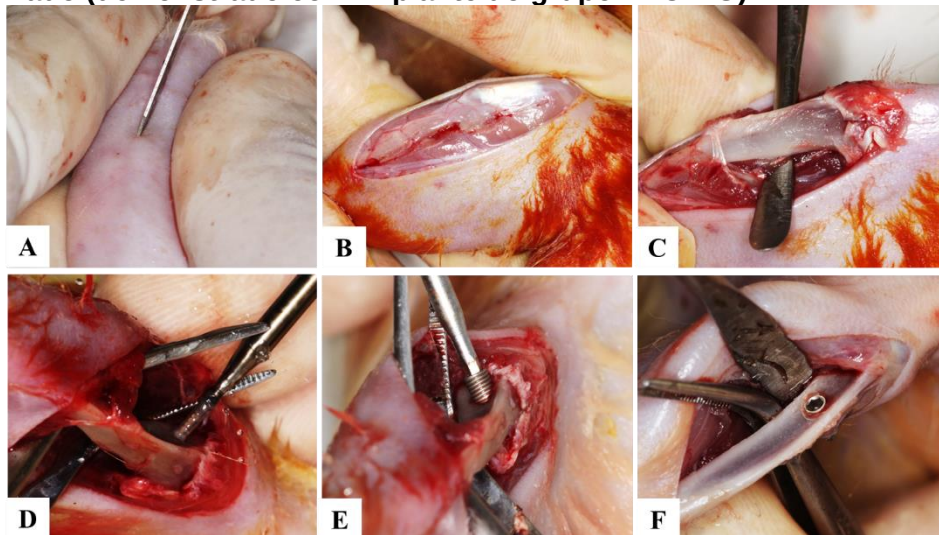
Posteriormente, foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI). Com uma lâmina número 15 foi realizada uma incisão na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo a tíbia. Assim, foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com as seguintes dimensões: diâmetro de 1,6 mm e altura de 4 mm.

Seguindo-se o procedimento cirúrgico, foi realizada fresagem com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP,

Brasil) a uma velocidade de 800 rpm, sob irrigação com solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9%, e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany), com travamento e estabilidade inicial manual de 15N.cm. Cada animal recebeu dois implantes, sendo um em cada metáfise tibial, de modo que cada animal recebe os dois implantes que foram utilizados neste estudo: com texturização controle (ZrAC) ou teste (PEO-BG).

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 4-0, Ethicon®, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura 5).

Figura 5 - Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Incisão de 1,5 cm de comprimento para acesso cirúrgico à metáfise tibial. (B) Exposição da musculatura sobreposta a metáfise tibial. (C) Metáfise tibial exposta. (D) Preparo do leito ósseo. (E) Instalação dos implantes com rosqueamento digital (demonstrado com implante do grupo ZrAC). (F) Representação do posicionamento final do implante bicorticalizado (demonstrado com implante do grupo PEO-BG).



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

3.3.3 Cirurgia de confecção de fraturas femorais e osteossíntese com instalação de miniplacas

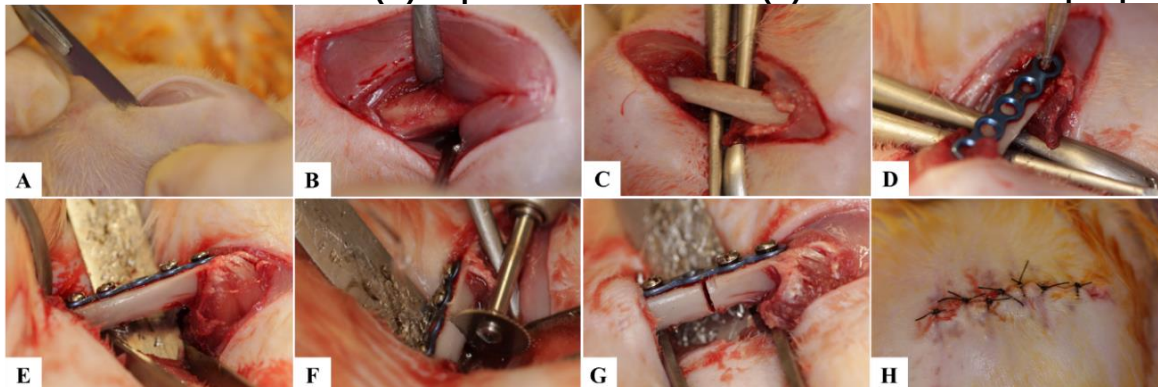
Da mesma forma que para a cirurgia de instalação de implantes, os animais passaram por jejum de 12 horas, foram sedados e receberam anestesia local, com

mepivacaína. Posteriormente, foi realizada tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo e, antissepsia da região.

Com uma lâmina número 15 foi feita uma incisão de 4 cm de comprimento na porção lateral do fêmur, assim, expondo bilateralmente o osso do polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur. Uma placa do sistema 1.5 mm com 4 furos, sem intermediário, foi fixada bilateralmente, sendo uma placa convencionalmente disponível pelo mercado, com ambas as superfícies usinadas (**CONV**) e, outra placa com as superfícies texturizadas pelo revestimento à base de vidro bioativo pela oxidação por plasma eletrolítico (**PEO-BG**). Para a simulação da fratura, um disco circular foi utilizado e assim, a osteotomia foi realizada na metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária.

Os 4 furos da placa foram fixados utilizando-se parafusos de 6mm, previamente determinado pelo profundímetro, após a perfuração bicortical com perfuradores do sistema (1,5 mm) (Figura 6). Durante toda manipulação ao tecido ósseo, as regiões foram irrigadas com solução salina fisiológica para evitar-se o aquecimento do tecido ósseo e assim, influenciar negativamente no reparo ósseo. Os tecidos foram suturados por planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Somerville, Nova Jersey, EUA) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Somerville, Nova Jersey, EUA) com pontos interrompidos no plano mais externo.

Figura 6 – Etapas para confecção de fraturas femorais, osteossíntese com instalação de miniplacas . (A) Realização de incisão na porção lateral do fêmur. (B) Localização da divisão anatômica entre os músculos lateral e bíceps do fêmur, servindo como referência para divulsão tecidual. (C) Fêmur exposto após divulsão. (D) Perfuração para instalação de parafusos. (E) Placa fixada com 4 parafusos bicorticais. (F) Simulação da fratura com disco circular. (G) Aspecto final da fratura. (H) Sutura – realizada por planos



3.4 Suspensão pela cauda

Com a finalidade de imobilizar as patas traseiras dos animais e evitar a ocorrência de fadiga das miniplacas ou má consolidação das fraturas, após as cirurgias, os animais, ainda sedados, foram suspensos pela cauda, por meio de uma modificação da técnica proposta por Silva et al. (39). A suspensão foi realizada com o auxílio de uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape). Desse modo, após colada ao rabo do animal, a própria fita foi utilizada para confecção de uma espécie de alça, que possibilitou sua apreensão à uma presilha metálica, que se encontrava conectada a uma barra de ferro, onde é possível regular a altura da suspensão. Para reforçar a bandagem, utilizou-se de três pedaços, de pequena largura, de esparadrapo, que foram colados nas periferias e no centro da fita elástica adesiva presa ao rabo do animal. Neste sistema de suspensão, os animais tiveram liberdade para movimentação dos membros torácicos, pois foram mantidos visualmente inclinados em aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho da caixa.

Apesar de alguns estudos demonstrarem uma relação direta entre a suspensão e a ocorrência de osteopenia e atrofia da musculatura, devido à falta de estímulos mecânicos na região das patas traseiras (39), espera-se que isso não influencie negativamente os resultados desse trabalho, visto que todos os animais foram submetidos a mesma situação. Além disso, se teve como objetivo simular uma situação crítica e que se aproxime da realidade clínica, como o que se tem nas fraturas de ossos longos, onde o paciente necessita de uma imobilização até que se tenha segurança para que o membro volte a entrar em função.

Durante todo o período entre a cirurgia e a eutanásia, os animais foram acompanhados todos os dias, onde foi verificada a integridade da suspensão, a disponibilidade de ração e água, a saúde geral e as feridas cirúrgicas. Além disso, todos os dias realizou-se antissepsia das feridas cirúrgicas e uma vez por semana a antissepsia da genitália do animal para evitar ocorrência de infecção urinária, que poderia ocorrer devido à dificuldade que o animal tem de fazer sua auto-higiene pela limitação de movimentação.

3.5 Métodos de análise

Após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais continuaram no biotério sob os cuidados da equipe. Aos 14 e 28 dias de pós-operatório, uma parte dos animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina, seguida de solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4 (40), e as tíbias e fêmures foram encaminhados para descalcificação conseguinte obtenção de lâminas para análise histológica e imunoistoquímica

4 ANÁLISE DE TECIDOS DESCALCIFICADOS

4.1 Análise histológica

Nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios, 5 tíbias e 4 fêmures de cada grupo foram encaminhados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento teve início com a descalcificação em EDTA (10%), com trocas semanais da solução, até que se observou ausência de resistência à passagem de uma agulha gengival extra curta, 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 (41–45).

Antes de realizar a inclusão propriamente dita, os implantes, placas e parafusos foram removidos cuidadosamente das tíbias e fêmures, respectivamente. Após a microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), para análise observando-se a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade óssea, com avaliação da maturidade e, quantidade de tecido ósseo, assim como presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos.

Avaliação quantitativa do tecido ósseo: As lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região do defeito ósseo crítico, inicialmente em uma objetiva de 4.0x, que garantiu uma visão ampla do defeito e permitiu a mensuração da *área total*

de tecido ósseo neoformado, a partir do software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA), por meio da ferramenta “Free hands”. A *extensão linear de contato osso-implante* também foi determinada, pela ferramenta “Straight” do mesmo software.

Avaliação qualitativa do tecido ósseo: Para observação da maturação e das características do tecido ósseo dos diferentes grupos, foram realizadas fotomicrografias em uma objetiva de 40x. Todas as imagens foram analisadas por um examinador cego e calibrado, e todos os parâmetros foram calculados de acordo com a Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado (46).

Avaliação do perfil inflamatório: Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, para cada amostra foram realizadas três fotomicrografias em objetivas de 100x, em diferentes regiões do defeito. Em seguida, no software Image J, será utilizada as ferramentas “Grid” e “Cell Counter Notice”, para localização e contagem propriamente dita das estruturas mencionadas.

4.2 Análise Imunoistoquímica

As lâminas ímpares foram destinadas as reações de imunoistoquímica, onde a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários a serem utilizados foram: anti-BMP-2 (BMP-2; sc-137087; Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A) osteoprotegerina (OPG; sc-390518; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL; sc-377079; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteocalcina (OC; sc-365797; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto a indução/formação (BMP-2) remodelação (OPG e RANKL) e mineralização óssea (OC).

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 quantitativamente, por meio da contagem das células marcadas (47,48). As imagens foram fotomicrografadas em objetiva de 100x,

em duas áreas distintas na região do defeito ósseo, e para a contagem de células marcadas foi utilizado o software Image J, com auxílio da ferramenta “Grid” do tipo “Crosses”, com um total de 130 “crosses” por imagem. O controle negativo foi realizado por meio do mesmo procedimento, mas em amostras sem aplicação de anticorpo primário(49,50).

5 ANÁLISE DE TECIDOS CALCIFICADOS

5.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados, os animais foram eutanasiados com 28 dias de pós-operatório e as peças foram removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70%, para serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. O escaneamento foi realizado por meio do microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 5 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios- X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens adequadas quanto ao posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área de interesse (ROI), que para o grupo de implantes correspondeu a uma região ao redor de todo o implante e para as miniplacas, correspondeu à área delimitada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur fraturado. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershould).

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado(46), foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo e BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas e Tb.N= número das trabéculas).

Planejamento estatístico

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos através das análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct), Histometria, Histologia e imunoistoquímica, em função dos grupos experimentais (Grupo ZrAc vs PEO-BG / Grupo CONV vs PEO-BG) vs tempo (14/28 dias), estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar se havia homogeneidade dos dados ($p > 0.05$). Assim, um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado, considerando $p < 0.05$. Todos os testes foram realizados no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis, San Jose, California, USA).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização topográfica

As superfícies utilizadas neste estudo: cpTi (correspondente a superfície de placa usinada, designada como placa CONV no estudo animal); ZrAc (superfície comercialmente disponível tratada com jateamento de zircônia e duplo ataque ácido, representa a superfície controle dos implantes utilizados no estudo animal) e PEO-BG (corresponde a superfície dos grupos experimentais tanto de implante quanto de placa), foram submetidas a uma caracterização topográfica com a finalidade de demonstrar a fiel reprodutibilidade da texturização proposta, bem como apresentar e discutir as características que podem diretamente se correlacionar com o comportamento reparacional na investigação animal (Figura 7).

6.1.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

As imagens bidimensionais (magnitude de 20x) obtidas através da análise de CLSM permitem apresentar a topografia superficial das três superfícies utilizadas neste estudo. Nesse sentido, para a superfície cpTi, foi observado um padrão de ranhuras lineares longitudinais distribuídas de forma homogênea, enquanto a superfície ZrAc apresentou poros distribuídos pela superfície com aspecto compatível aos procedimentos de subtração ao qual foi submetida (jateamento de zircônia e duplo ataque ácido). Por sua vez, a superfície produzida por PEO-BG gerou uma superfície com rugosidades distribuídas de forma irregular e com agregados não uniformes (Figura 7– A).

Na análise tridimensional (magnitude de 50x) foi possível constatar que as regiões de rugosidades de PEO-BG se apresentam como elevações com diferentes alturas entre as regiões de “picos” e “vales”, enquanto ZrAc e cpTi apresentam, respectivamente, superfícies com tendência exponencial ao aplainamento. A análise quantitativa de Área de superfície obtida através de CLSM comprova que PEO-BG apresenta a maior área de superfície entre as amostras testadas ($<0,001$). Também houve diferença significativamente estatística entre as superfícies cpTi e ZrAc ($<0,001$) (Figura 7– B).

6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Através da análise de EDS foi demonstrado para a superfície PEO-BG uma proporção correspondente ao que se esperava obter após o tratamento, isto é, com aumento na porcentagem de oxigênio ao titânio e incorporação dos íons utilizados na solução eletrolítica, inclusive o Si (Figura 7 -C).

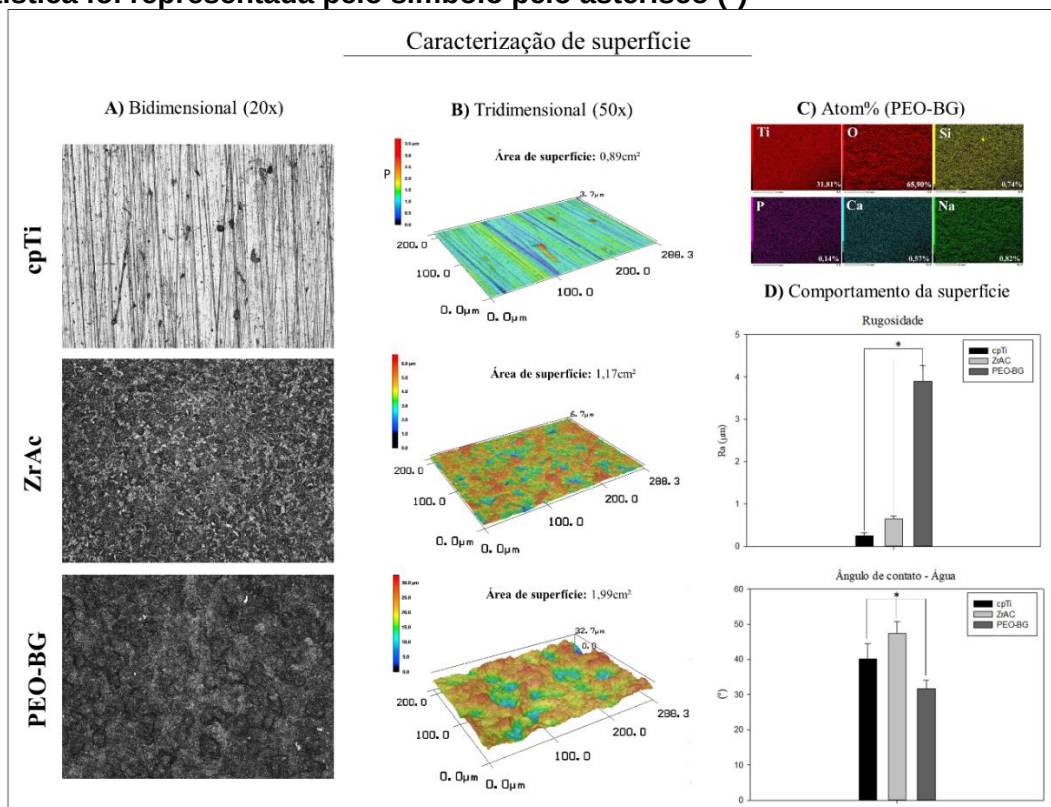
6.1.3 Rugosidade de superfície

PEO-BG apresentou valores de rugosidade média (R_a)=3,897 μ m significativamente maiores do que cpTi (0,2445 μ m) e ZrAC (0,649 μ m) (<0,001) (Figura 7 -D).

6.1.4 Ângulo de contato – água

Com relação ao ângulo de contato com água, foi observado menor ângulo para o grupo PEO-BG (31.72°), seguido de cpTi (40.24°) e ZrAc (47.33°) (($p < 0,05$) (Figura 7-D).

Figura 7 – Imagens representativas dos resultados de caracterização topográfica das amostras das três superfícies utilizadas no estudo. (A) Imagens bidimensionais da análise de CLSM em magnitude de 20x. (B) Imagens tridimensionais de CLSM em magnitude de 50x. (C) Mapa de cores da proporção atômica dos componentes presentes na superfície. (D) Valores de rugosidade dos grupos experimentais. (E) Representação gráfica dos valores de ângulo de contato com a água. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*)



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

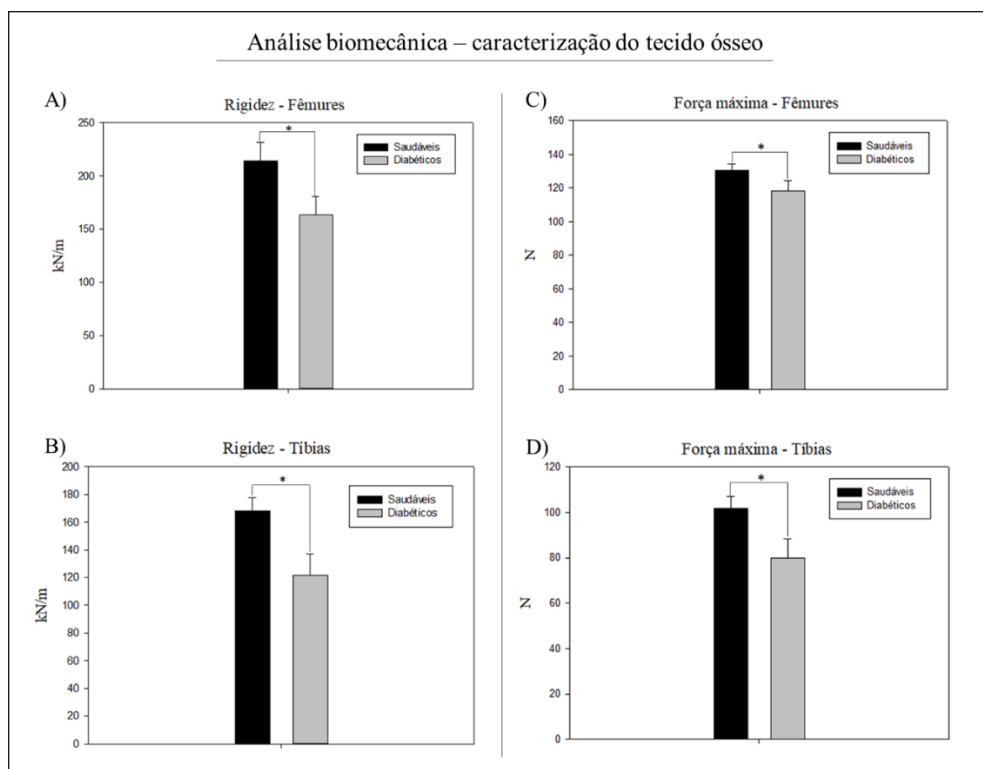
6.2 Estudo in vivo

6.2.1 Análise comprobatória de redução da DMO – Biomecânica

De acordo com a proposta de utilização de modelo animal com baixa densidade mineral óssea através da Diabetes Mellitus experimentalmente induzida, foi realizada uma análise adicional de flexão de três pontos, onde foi demonstrado que os animais diabéticos apresentaram menores valores de rigidez óssea, tanto para as tíbias (121,45 kN/m) quanto para os fêmures (163,19 kN/m) em relação as amostras ósseas (Tíbias - 168,13 kN/m; Fêmures - 214,45 kN/m) de animais saudáveis, isto é, que não foram submetidos a aplicação de estreptozotocina ($p < 0,05$) (Figura 8 – A e B).

Isso também foi observado sobre a força máxima exercida durante os testes, em que os animais diabéticos apresentaram valores de força menores (Tíbias- 79,73N; Fêmures- 118,07N), com diferença estatística ($p < 0,05$), em relação as amostras de animais saudáveis (Tíbias-101,79N; Fêmures-130,29N) (Figura 8-C e D).

Figura 8- Imagens gráficas referentes aos resultados da análise biomecânica de caracterização do tecido ósseo dos animais diabéticos em comparação com animais saudáveis, através da utilização de tíbias e fêmures não operados. (A) Resultados de rigidez para fêmures. (B) Resultado de rigidez das tíbias. (C) Força máxima para os fêmures. (D) Força máxima para as tíbias. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*).



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

6.3 – Estudo de osseointegração – IMPLANTES

6.3.1 Análise histológica

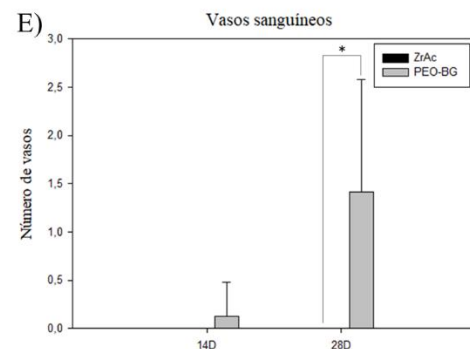
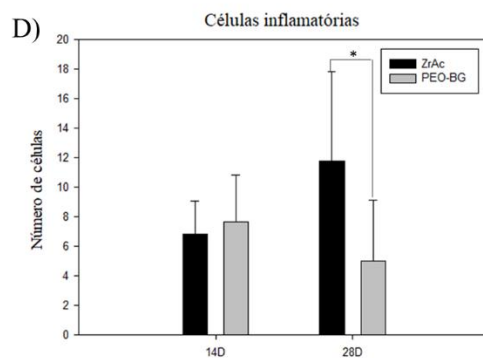
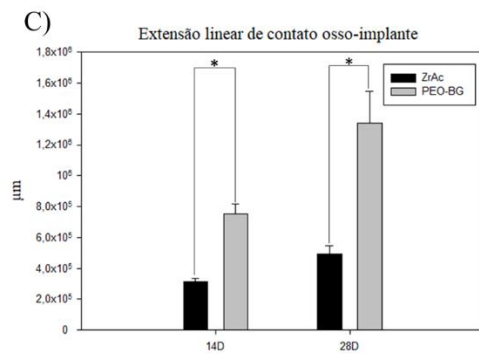
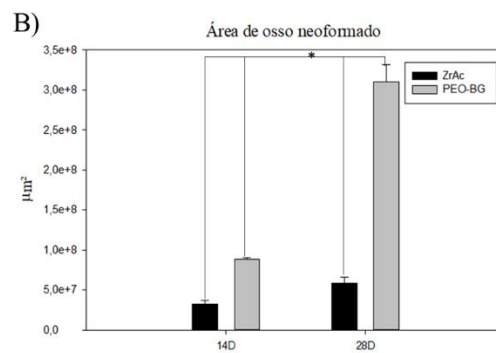
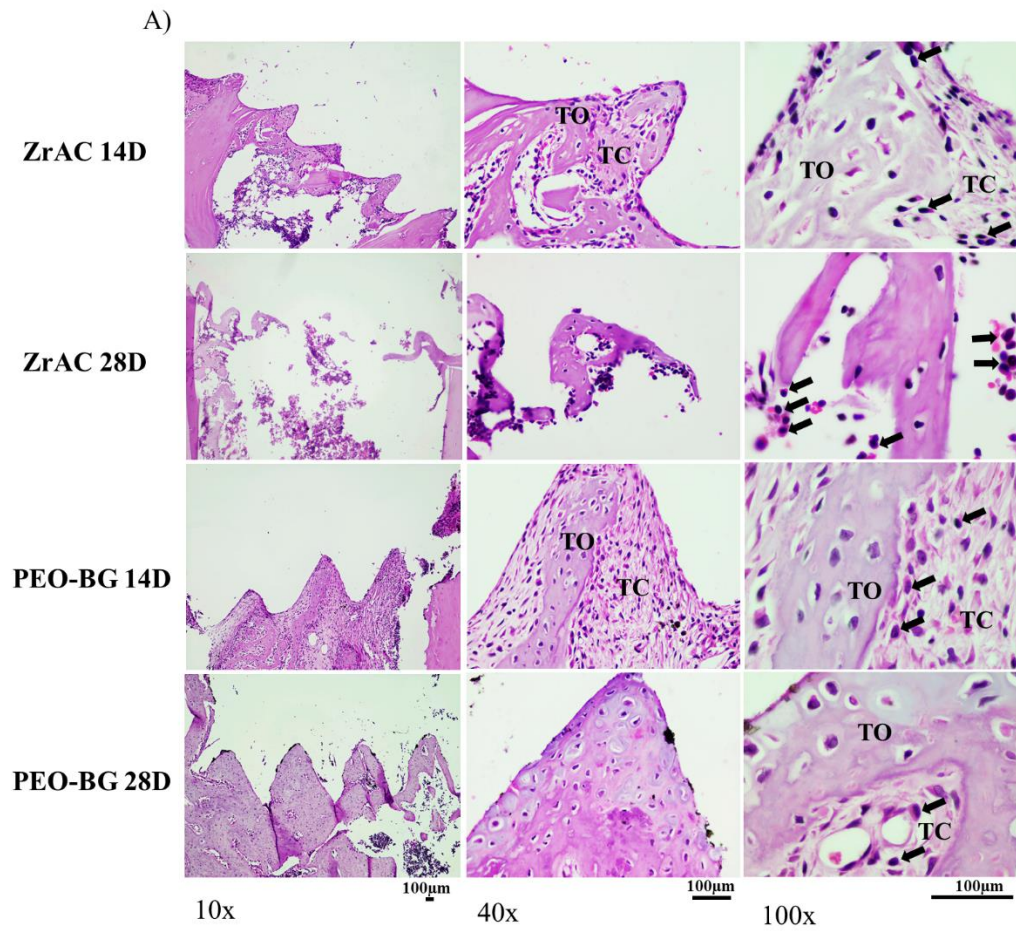
Os resultados da análise histológica referentes a área de osso neoformado demonstraram formação óssea superior para as amostras em que foram utilizados os implantes do grupo experimental. O grupo PEO-BG apresentou valores de neoformação superiores a ZrAc tanto aos 14 dias quanto aos 28 dias ($p < 0,05$) (Figura 9– B). Com relação aos valores de extensão linear de contato osso-implante, PEO-BG apresentou maiores regiões lineares de contato ósseo do que ZrAc, em ambos os tempos experimentais ($p < 0,001$) (Figura 9- C).

Além da análise quantitativa, a partir das fotomicrografias também foi possível observar qualitativamente o tecido ósseo neoformado, em que se constatou um padrão de reparação mais maduro para o grupo PEO-BG em ambos os tempos operatórios, evidenciado pelo espaço periimplantar na região das espiras que estava com maior formação de osso, um tecido mais organizado e menor quantidade de células do tecido conjuntivo (Figura 9-A).

Com relação ao perfil inflamatório, que teve como ênfase a contagem de linfócitos e de vasos sanguíneos, foi observado um padrão de inflamação similar para ambos os grupos aos 14 dias ($p > 0,05$). Entretanto, aos 28 dias, o grupo ZrAC apresentou maiores valores na contagem de células inflamatórias e menor quantidade de vasos sanguíneos, em relação ao grupo PEO-BG ($p < 0,05$) (Figura 9– D e E).

Figura 9 – Imagens referentes a análise histológica das amostras de implantes instalados em tíbias. (A) Fotomicrografias representativas em magnitudes de 10x, 40x e 100x, respectivamente. (B) Valores de área de osso neoformado para os grupos experimentais. (C) Resultados de área de contato osso-implante. (D) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (E) Representação gráfica de contagem de vasos sanguíneos. As setas pretas demonstram o padrão de célula que foi considerada na contagem (linfócitos). TO – Tecido ósseo; TC- Tecido conjuntivo; A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*).

Análise histológica



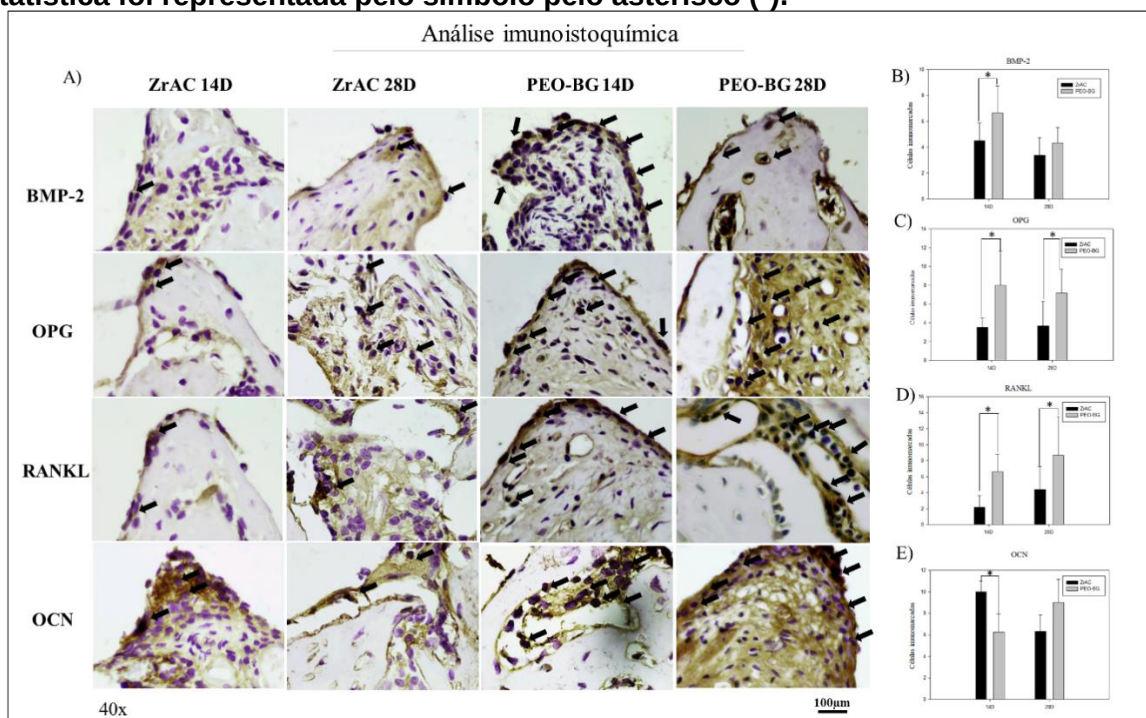
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

.3.2 Análise imunoistoquímica

A partir da análise imunoistoquímica foi observado que para ambos os implantes utilizados (ZrAC e PEO-BG) houve expressão, mesmo que leve para algumas amostras, de todas as proteínas utilizadas neste estudo, isto é, BMP-2, OPG, RANKL e OCN (Figura 10 -A).

Para BMP-2 houve maior imunomarcção para o grupo PEO-BG em ambos os tempos pós-operatórios, mas principalmente aos 14 dias, com diferença significativamente estatística ($p=0,048$) (Figura 10- B). A expressão de OPG também foi significativamente maior para PEO-BG em ambos os tempos quando comparado a ZrAC ($p<0,05$) (Figura 10- C). Quanto a RANKL, a expressão também foi significativamente mais marcada para PEO-BG ($p<0,05$) aos 14 e 28 dias de pós-operatório (Figura 10- D). Já para OCN, aos 14 dias houve maior marcação para o grupo ZrAC, com diferença significativamente estatística ($p=0,017$) o que se inverteu aos 28 dias e PEO-BG demonstrou maior marcação, entretanto sem significância (Figura 10- E).

Figura 10 – Figuras representativas da análise imunoistoquímica. (A) Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcção das respectivas proteínas. (B) Valores de imunomarcção de BMP-2. (C) Valores de imunomarcção de OPG. (D) Valores de imunomarcção de RANKL. (E) Valores de imunomarcção de OCN. A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*).



6.3.3 Análise microtomográfica

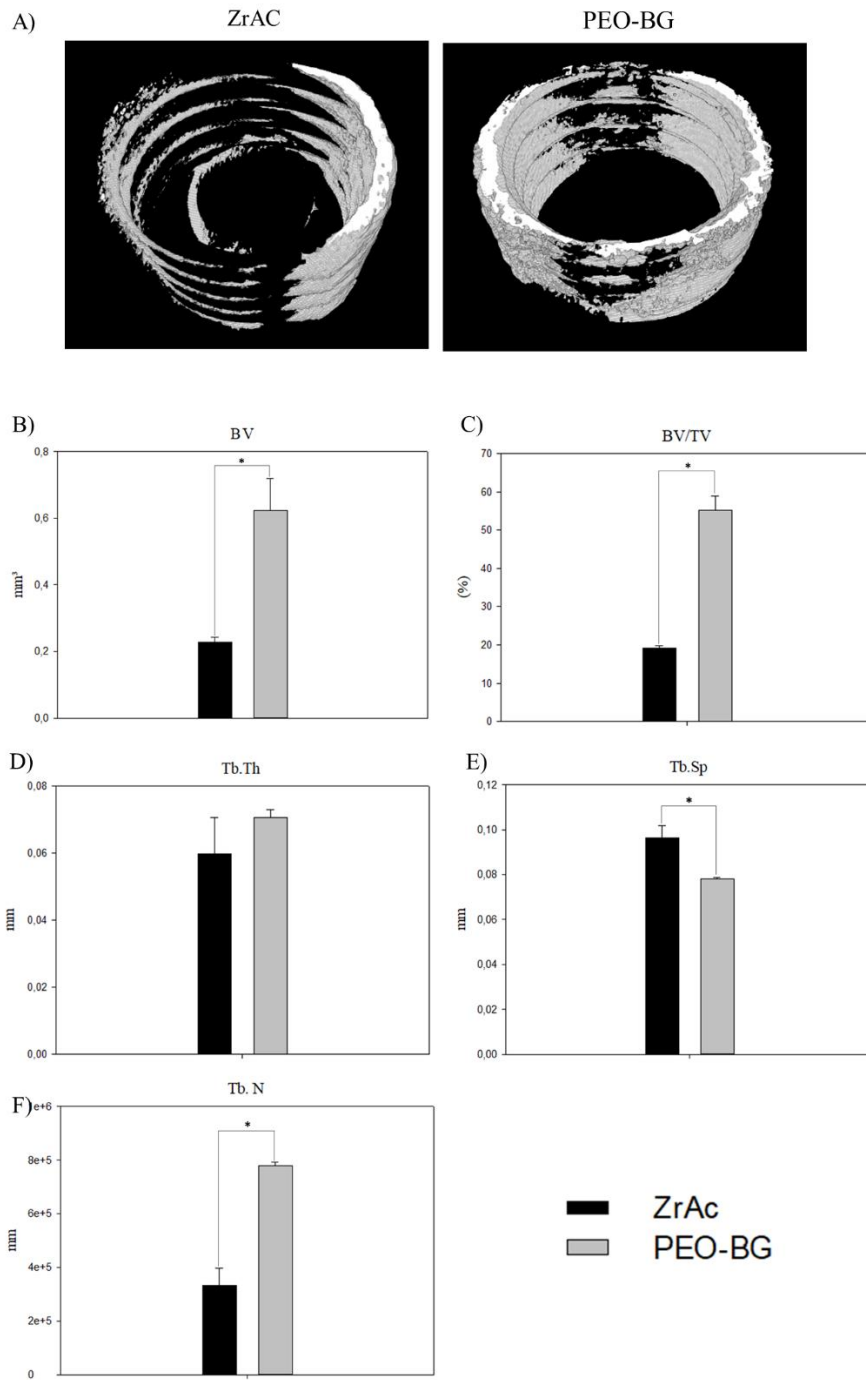
A partir da análise tomográfica foi possível realizar a caracterização microestrutural do tecido ósseo ao redor dos implantes ZrAc e PEO-BG aos 28 dias pós-operatório. Já na imagem tridimensional, utilizada como meio de representação dos resultados, é demonstrado que PEO-BG levou a formação de espiras mais robustas e com distribuição mais homogênea ao redor de todo o implante. Enquanto, ZrAc apresentou espiras mais delgadas na maior parte do implante com maior dificuldade de osseointegração (Figura 11-A).

Com relação aos parâmetros de quantidade do tecido ósseo, volume ósseo (BV) e a porcentagem de volume ósseo (BV/TV) apresentaram valores significativamente maiores para PEO-BG ($P = <0,001$) (Figura 11 – B e C).

Já no que diz respeito aos parâmetros de qualidade do tecido ósseo, a espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) foi bastante similar entre os grupos (Figura 11 – D). A separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp) foi maior para ZrAC ($P = 0,029$) (Figura 11 – E). Já o número de trabéculas (Tb.N) foi superior para PEO-BG ($P = 0,029$) (Figura 11 – F).

Figura 11 – Imagens referentes a análise microtomográfica. (A) Representação tridimensional da área óssea ao redor do implante. (B) Representação gráfica dos valores de volume ósseo (BV). (C) Representação gráfica da porcentagem de volume ósseo (BV/TV). (D) Representação gráfica dos valores de espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th). (E) Representação gráfica de separação das trabéculas ósseas. (F) Representação gráfica do número de trabéculas (Tb.N). A diferença estatística foi representada pelo símbolo pelo asterisco (*).

Análise microtomográfica



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

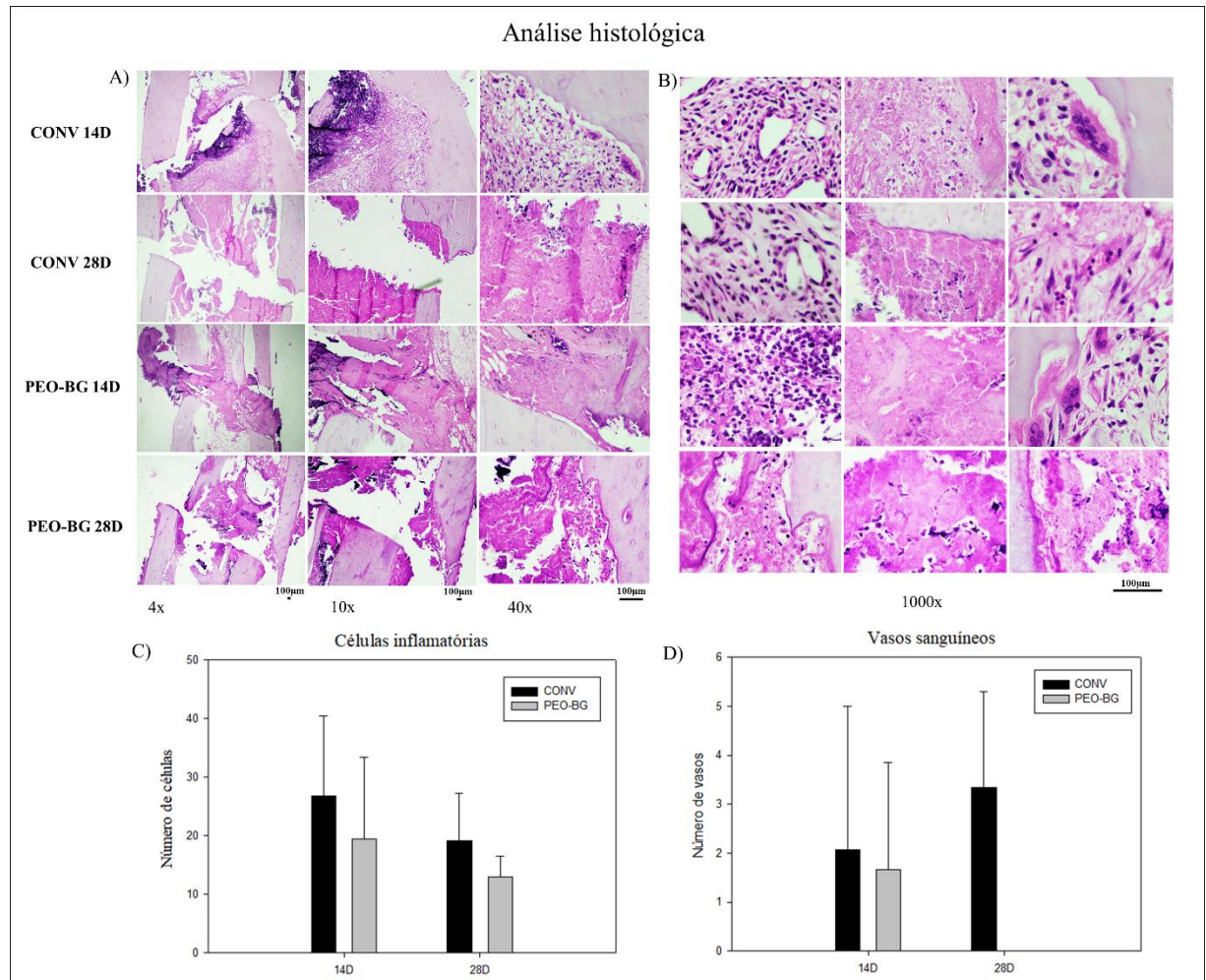
6.4 Estudo de reparo ósseo – PLACAS

6.4.1 Análise histológica

A análise histológica das placas confirmou uma problemática encontrada durante o período de desenvolvimento do estudo, isto é, a grande ocorrência de infecção do sítio cirúrgico pós-operatório, decorrente da condição de diabetes mellitus. As fotomicrografias demonstram áreas de intenso infiltrado inflamatório, diversas regiões com hifas de bactérias (áreas arroxeadas), intensa atividade de macrófagos e até mesmo áreas de necrose óssea. Essa apresentação condiz com o aspecto encontrado em algumas amostras nos períodos de eutanásia, em que, por mais que houvesse integridade de sutura e ausência de fatores predisponentes externos, ao abrir as feridas foi possível notar presença de coleção purulenta e uma região de gap reparacional com aspecto de “vazio”. Diante disso, nenhuma das amostras apresentou tecido ósseo neoformado para que fosse considerado através da análise histométrica (Figura 12 - A e B).

Ainda assim, a análise de perfil inflamatório foi realizada, a fim de verificar as reações dos tecidos adjacentes as placas com as diferentes superfícies e avaliar se houve diferenças entre elas frente a situação extremamente crítica ao qual os animais diabéticos foram submetidos. Nesse sentido, a contagem de células inflamatórias apresentou valores semelhantes entre os grupos aos 14 e 28 dias ($p>0,05$). O mesmo ocorreu com a quantidade de vasos sanguíneos que foi significativamente menor para PEO-BG aos 28 dias pós-operatório (Figura 12 – C e D).

Figura 12 - Representação da análise histológica para miniplacas de titânio. (A) e (B) Fotomicrografias representativas da análise das placas nas magnitudes de 4x, 10x, 40x e 100x, sendo possível verificar regiões de maiores infiltrados inflamatórios, regiões de necrose tecidual e ausência de reparo ósseo. (B) Representação gráfica da contagem de células inflamatórias. (C) Representação gráfica da quantidade de vasos sanguíneos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

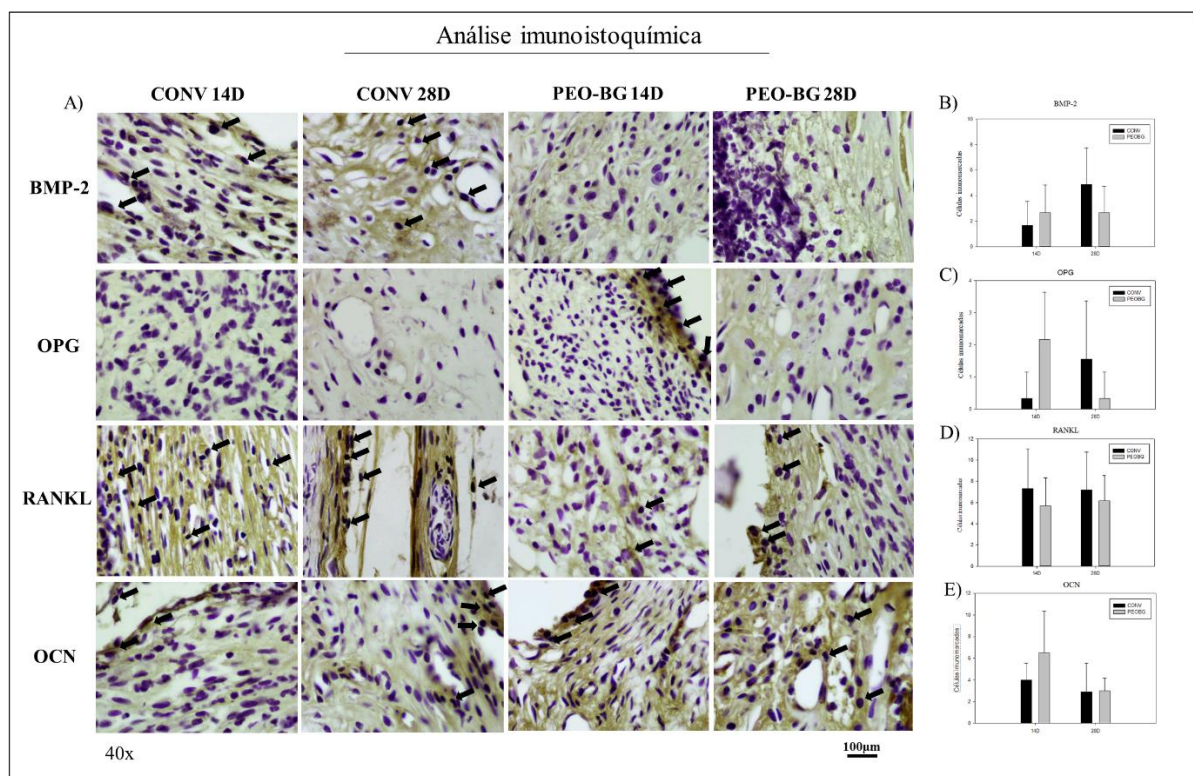
6.4.2 Análise imunoistoquímica

Apesar da condição limitante em decorrência da infecção pós-operatória, a maioria das amostras apresentou algum nível de imunomarcação (Figura 13 – A).

A imunomarcação de BMP-2 aos 14 dias apresentou PEO-BG ligeiramente superior a ZrAc, enquanto, aos 28 dias, houve uma inversão e ZrAc apresentou maior marcação, sem diferenças significativamente estatísticas em nenhuma das duas situações (Figura 13– A). O mesmo ocorreu com OPG, que no início (14 dias) apresentou maior expressão de PEO-BG e em seguida houve importante redução

para este grupo, sobressaindo a marcação de ZrAC, todos sem diferença significativamente estatística (Figura 13 – B). Com relação a RANKL, os grupos apresentaram valores similares entre si em ambos os tempos pós-operatórios, com discreta superioridade de marcação para ZrAc mas sem significância (Figura 13-C). Para OCN, PEO-BG apresentou maiores valores aos 14 dias e aos 28 dias, os grupos tiveram expressão igualada. Também sem diferenças significativamen0te estatísticas (Figura 13– D).

Figura 13 – Figuras representativas da análise imunoistoquímica. (A) Fotomicrografias das regiões de espiras com imunomarcção das respectivas proteínas. (B) Valores de imunomarcção de BMP-2. (C) Valores de imunomarcção de OPG. (D) Valores de imunomarcção de RANKL. (E) Valores de imunomarcção de OCN

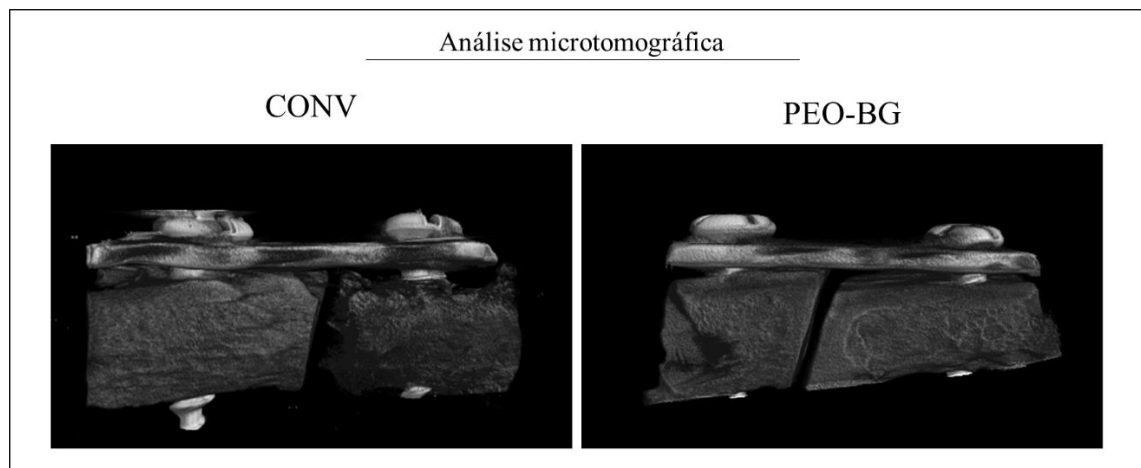


Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

6.4.3 Análise microtomográfica

As imagens tridimensionais referentes a análise microtomográfica foram obtidas para demonstrar que além das amostras que passaram pelo processo de descalcificação e foram utilizadas para avaliação histológica e imunoistoquímica, as demais amostras, ou seja, que foram destinadas a avaliação de tecidos calcificados, também passaram pela mesma situação de intensa infecção e reabsorção óssea, inclusive sem a formação de tecido ósseo em nenhum dos grupos (CONV e PEO-BG) como observado na Figura 14. Diante disso, os parâmetros de quantidade e qualidade óssea não foram avaliados.

Figura 14 – Imagem tridimensional representativa do aspecto observado nas amostras de fêmures para os grupos CONV e PEO-BG, obtido através da microtomografia computadorizada.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

6 DISCUSSÃO

Através dos desfechos obtidos neste estudo *in vivo*, que teve como principal objetivo avaliar os efeitos de um novo revestimento de oxidação por plasma eletrolítico à base de vidro bioativo (PEO-BG), foi possível verificar algumas propriedades osteoindutoras relacionadas a superfície, que associa os benefícios biológicos da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) e do vidro bioativo (BG).

Marques et al. (2015) (51,52) avaliaram, *in vitro*, os efeitos da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), em que provou a capacidade de PEO em promover melhores respostas biológicas, mecânicas e melhorias com relação a corrosão dos materiais de titânio, com ênfase maior aos implantes osseointegrados. O vidro bioativo, também conhecido como biovidro, despertou interesse para a engenharia de tecidos e regeneração óssea por apresentar cálcio e fosfato em sua composição, componentes importantes para a formação natural da hidroxiapatita óssea. Sua exposição aos fluidos corporais leva a formação de uma superfície permissível a nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita, o que é altamente favorável para interação de osteoblastos(53). Diante dessas características, o biovidro vem sendo amplamente investigado para aplicação como revestimento de cerâmicas, produção de scaffolds, aplicação em superfícies diversas, associações com outros materiais, dentre outras aplicações na engenharia tecidual(54–56). Acredita-se ainda que sejam eficientes para melhorar a revascularização, adesão de osteoblastos, atividade enzimática e diferenciação de células tronco mesenquimais(57).

A associação destas importantes propriedades do biovidro com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), realizada pela primeira vez por Costa et al. (2020) levantou expectativas acerca da nova superfície, que já nos estudos *in vitro* apresentou uma topografia altamente hidrofílica, com melhores propriedades mecânicas e tribológicas do Ti, maior resistência a corrosão, modulação positiva de biofilmes polimicrobianos, maior adsorção de proteínas plasmáticas e ausência de efeitos citotóxicos em células humanas. Todas essas propriedades levaram a hipótese de que PEO-BG seria uma superfície potencialmente osteoindutora, especialmente o fato de apresentar uma alta afinidade aos componentes minerais do tecido ósseo e também a capacidade de atratividade celular aumentada.

Nesse sentido, este estudo teve grande importância para apresentar de forma inédita as respostas fisiológicas do organismo, mesmo que animal, a topografia gerada por PEO-BG. A caracterização topográfica realizada inicialmente neste estudo, foi essencial para demonstrar a reprodutibilidade da superfície e as vantagens microestruturais em comparação as demais superfícies utilizadas. Através da Espectroscopia de Energia Dispersiva foi observada a proporção atômica dos componentes da superfície e com isso garantida a efetiva incorporação dos componentes precursores do biovidro aos implantes e placas utilizados.

PEO-BG se mostrou com topografia diferenciada, visto que nas análises bidimensionais e tridimensionais apresentou rugosidades expressivas distribuídas homogeneamente por toda a superfície das amostras, e ainda, com valores de área de superfície significativamente maiores do que as demais amostras (cpTi e ZrAc). O resultado de rugosidade média de superfície corroborou com as imagens, tendo PEO-BG com os maiores valores de rugosidade. Ainda, o grupo PEO-BG apresentou menores valores para ângulo de contato com a água, o que demonstra sua maior capacidade de molhabilidade, o que também foi observado por Costa, et al. (2020). A somatória de todos esses fatores está diretamente atrelada a favorecimento da superfície em interagir com o sangue, proteínas, citocinas e células da linhagem osteogênica, o que por sua vez, gera favorecimento ao reparo ósseo.

O desejo de melhorar as condições de reparo ósseo surge principalmente devido as limitações que se encontra ambulatoriamente no tratamento de pacientes com questões sistêmicas fortemente desafiadoras, como o que se tem principalmente na osteoporose e na diabetes mellitus(15,19). Por essa razão que a diabetes mellitus experimentalmente induzida foi escolhida como modelo animal, ou seja, para simular uma situação crítica e avaliar se a superfície experimental teria ação local suficiente para produzir o reparo ósseo mesmo em uma situação de redução da densidade mineral óssea em decorrência da diabetes.

A condição de redução da densidade mineral óssea foi devidamente comprovada pela análise biomecânica de flexão de três pontos, a qual as amostras que não passaram por procedimento cirúrgico foram submetidas, e foi observado que as tíbias e fêmures dos animais diabéticos apresentaram menores valores de rigidez óssea e de força máxima durante o ensaio de força vertical. Entretanto, observou-se que este modelo foi excessivamente crítico, uma vez que a grande maioria das

amostras apresentou infecção local, mesmo sem ocorrência de deiscência de sutura e sem contaminantes externos.

Além de reduzir de forma expressiva a densidade óssea mineral, a diabetes tem importante efeito na dificuldade de reparo ósseo e consolidação de fraturas, pois aumenta o ambiente pró-inflamatório no osso e afeta a angiogênese. O comprometimento vascular relacionado a diabetes afeta a entrega de nutrientes e oxigênio, bem como a remoção de resíduos do local de fratura e renovação tecidual. Esse ambiente torna-se, portanto, limitante para a neoformação óssea e favorável ao desenvolvimento de infecções(15,58,59).

Nesse sentido, as amostras de implantes por se localizarem em um tecido ósseo mais fino e de reparação mais rápida, não foram tão afetadas e tiveram excelentes resultados com demonstração dos efeitos de PEO-BG. Por outro lado, as amostras que passaram por confecção de fratura femoral acabaram sendo expostas a um estresse cirúrgico e pós-operatório maior, o que atrelado a infecção, impossibilitou a neoformação óssea. Com isso, chegou-se à conclusão de que para os testes de fratura, o modelo animal ovariectomizado é mais interessante e uma nova investigação será realizada com PEO-BG neste modelo experimental. Por essa razão, a discussão aqui apresentada levará em conta apenas os resultados referentes ao estudo em implantes.

Através da avaliação da área de osso neoformado, desfecho primário deste estudo, foi observada uma neoformação periimplantar significativamente maior para o grupo PEO-BG em ambos os períodos pós-operatórios. A região periimplantar das amostras de PEO-BG foi demarcada por espiras bem estruturadas, com tecido organizado em menores quantidades de células inflamatórias, mais osteoblastos e vasos sanguíneos, o que demonstra maior maturidade óssea para este grupo em comparação com os implantes ZrAC, em que, apesar de também ter uma neoformação óssea, esta se apresentou bastante inferior, com espiras menores e de tecido desorganizado. Similarmente, a região de contato osso-implante, foi maior para PEO-BG, o que associado a área de osso neoformado, demonstram capacidade de osseointegração otimizada para este grupo.

A avaliação de perfil inflamatório demonstrou ainda que ZrAc apresentou maiores infiltrados inflamatórios, o que também acaba atuando como um fator

limitador do reparo ósseo. Trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa já haviam comprovado os benefícios da oxidação por plasma eletrolítico com adição de cálcio e fosfato no reparo ósseo periimplantar e na consolidação óssea de fraturas femorais em animais osteoporóticos, onde foi capaz de acelerar e otimizar o reparo ósseo e levá-lo a uma situação próximo ao que ocorreu em um animal totalmente saudável, isto é, sem alterações de densidade mineral óssea(20,28,29).

Os resultados da análise histológica foram corroborados com os dados de imunomarcagem das proteínas investigadas. A BMP-2, que representa os períodos iniciais da neoformação óssea, apresentou aos 14 dias, uma expressão significativamente maior para PEO-BG, o que consequentemente está relacionado a maior recrutamento de osteoblastos e condiz com os maiores valores de neoformação óssea para PEO-BG já nesse período. Enquanto isso, a expressão de RANKL e OPG, proteínas relacionadas a atividade dos osteoclastos e consequentemente a modulação dos processos de reabsorção e deposição óssea, também se apresentaram significativamente maiores para PEO-BG em comparação a ZrAc, o que demonstra que para este grupo há um maior turnover ósseo, fator também importante para a renovação tecidual e deposição de matriz óssea. Por sua vez, a expressão de OCN, marcador relacionado aos períodos de deposição de matriz mineral óssea, se apresentou significativamente maior para ZrAc aos 14 dias, enquanto aos 28 dias houve uma inversão, com PEO-BG ligeiramente superior. Comparando este resultado de OCN com os demais desfechos, pode-se especular que ZrAc apresentou superioridade de imunomarcagem aos 14 dias por apresentar uma mineralização do tecido ósseo mais atrasado do que PEO-BG, que já estava em uma fase mais madura da neoformação.

A análise microtomográfica corroborou expressivamente com a avaliação histométrica, visto que gerou resultados de volume e porcentagem de volume ósseo significativamente maiores para PEO-BG, observado principalmente pela representação tridimensional, que contou com espiras mais robustas e de distribuição mais homogênea ao redor do implante, no período de 28 dias pós-operatório. Ainda, com relação a qualidade do tecido ósseo neoformado, PEO-BG apresentou maior número de trabéculas ósseas, enquanto que ZrAc teve trabéculas mais separadas. A espessura do trabeculado ósseo foi similar entre os dois grupos experimentais.

Com a otimização do reparo ósseo em região periimplantar promovida pela superfície PEO-BG em comparação a uma superfície de jateamento de zircônia e duplo ataque ácido (ZrAc) é possível prever que a aplicação deste simples tratamento pode ser um grande diferencial a osseointegração, principalmente em situações em que se espera dificuldades reparacionais. É importante lembrar que pacientes diabéticos muitas vezes passam pelo inconveniente das falhas dos implantes, o que gera a necessidade de reintervenções cirúrgicas e consequente aumento da morbidade e dos custos relacionados ao tratamento(15,16,60). Ainda, existem situações em que o paciente desiste da reabilitação por implantes e opta por uma prótese mucossuportada, que apresenta eficácia mastigatória e condição de qualidade de vida inferior ao que se tem diante dos implantes osseointegráveis.

Nesse sentido, ainda que diante das limitações deste estudo pré-clínico, que foram diretamente relacionadas ao modelo animal escolhido, é possível prever que a técnica de PEO-BG, que além de todas as vantagens já mencionadas, é de fácil realização, baixo custo a longo prazo e não se deteriora após esterilização por autoclave, tem alto potencial de aplicação clínica, com expectativa de reduzir a ocorrência de falhas de implantes e assim, garantir maiores sucessos nas reabilitações orais.

Ainda, os autores acreditam que futuros estudos com diferentes tempos de carregamento de implantes em modelo ósseo de baixa densidade mineral em regiões posteriores de maxila ou mandíbula seriam de alto interesse científico para melhor investigar e validar a capacidade de aceleração da osseointegração em implantes revestidos por PEO-BG.

7 CONCLUSÃO

A partir desta investigação *in vivo*, foi possível concluir que o revestimento de oxidação por plasma eletrolítico à base de vidro bioativo apresentou potencial osteoindutivo, o que aumentou de forma significativa os parâmetros do reparo ósseo periimplantar na tíbia de ratos com diabetes mellitus experimentalmente induzida.

REFERÊNCIAS

1. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015 Jan;70:93–101.
2. Snauwaert K, Duyck J, van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. Time dependent failure rate and marginal bone loss of implant supported prostheses: a 15-year follow-up study. *Clin Oral Investig*. 2000 Mar;4(1):13–20.
3. Chukwulebe S, Hogrefe C. The Diagnosis and Management of Facial Bone Fractures. *Emerg Med Clin North Am*. 2019;37(1):137–51.
4. Ayoub A, Al-Fotawei R. Biomaterials in the Reconstruction of the Oral and Maxillofacial Region. *Front Oral Biol*. 2015;17:101–14.
5. Liedert A, Kaspar D, Augat P, Ignatius A, Claes L. Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. Moscow; 2005.
6. Morgenstern M, Erichsen C, von Rüden C, Metsemakers WJ, Kates SL, Moriarty TF, et al. Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients. *Injury*. 2016;47(7):1427–34.
7. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Jakob M, Balmelli C, Schaefer DJ, et al. Validation of a treatment algorithm for orthopaedic implant-related infections with device-retention—results from a prospective observational cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(5):457.e1-457.e9.
8. Manchanda K, Nakonezny P, Sathy AK, Sanders DT, Starr AJ, Wukich DK. A systematic review of ankle fracture treatment modalities in diabetic patients. *J Clin Orthop Trauma*. 2021;16:7–15.
9. Kempegowda H, Richard R, Borade A, Tawari A, Graham J, Suk M, et al. Obesity Is Associated With High Perioperative Complications Among Surgically Treated Intertrochanteric Fracture of the Femur. *J Orthop Trauma*. 2017 Jul;31(7):352–7.
10. Lang LA, Hansen SE, Olvera N, Teich S. A comparison of implant complications and failures between the maxilla and the mandible. *J Prosthet Dent* [Internet]. 2019;121(4):611–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022391318305912>
11. Chappuis V, Avila-Ortiz G, Araújo MG, Monje A. Medication-related dental implant failure: Systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Oct;29 Suppl 1:55–68.
12. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Jan;8(3):133–43.
13. Karlamangla AS, Burnett-Bowie SAM, Crandall CJ. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018 Dec;45(4):695–708.
14. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Sep;44(3):517–30.
15. Murray CE, Coleman CM. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep;20(19).

16. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Oct;13(5):327–35.
17. Martins JM, Aranha P. Abnormal Mineral Metabolism in Diabetic Patients -Relevance to Micro and Macrovascular Disease and to Bone Metabolic Disorder. *J Diabetes Treat*. 2018;142.
18. Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater* [Internet]. 2014;10(1):394–405. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113004807>
19. Kanazawa I, Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern Med*. 2018 Oct;57(19):2773–85.
20. Momesso GAC, Polo TOB, da Silva WPP, Barbosa S, Freitas GP, Lopes HB, et al. Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats. *Materials Science and Engineering: C* [Internet]. 2021;120:111775. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493120336948>
21. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2018 Nov;9(4):e12349.
22. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *Biomed Res Int*. 2015;2015:791725.
23. Oliveira N, Guastaldi F, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15 3:427–37.
24. Hatamleh MM, Wu X, Alnazzawi A, Watson J, Watts D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dental Materials* [Internet]. 2018;34(4):676–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564118300423>
25. 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. *Periodontol 2000*. 2017 Feb;73(1):218–27.
26. Walsh FC, Low CTJ, Wood RJK, Stevens KT, Archer J, Poeton AR, et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Transactions of the IMF*. 2009;87(3):122–35.
27. Akatsu T, Yamada Y, Hoshikawa Y, Onoki T, Shinoda Y, Wakai F. Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Dec;33(8):4871–5.
28. Polo TOB, Silva WPP, Momesso GAC, Lima-Neto TJ, Barbosa S, Cordeiro JM, et al. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: an in vivo study. *Sci Rep*. 2020 Jun;10(1):10000.
29. Polo TOB, Momesso GAC, Silva WPP, de Souza Santos AM, Fonseca-Santos JM, da Cruz NC, et al. Is an anodizing coating associated to the photobiomodulation able to

- optimize bone healing in ovariectomized animal model? *J Photochem Photobiol B* [Internet]. 2021;217:112167. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134421000452>
30. Momesso GAC, Santos AM de S, Fonseca E Santos JM, da Cruz NC, Okamoto R, Barão VAR, et al. Comparison between Plasma Electrolytic Oxidation Coating and Sandblasted Acid-Etched Surface Treatment: Histometric, Tomographic, and Expression Levels of Osteoclastogenic Factors in Osteoporotic Rats. *Materials (Basel)*. 2020 Apr;13(7).
 31. Echeverry-Rendón M, Galvis O, Aguirre R, Robledo S, Castaño JG, Echeverría F. Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Sep;28(11):169.
 32. He J, Feng W, Zhao BH, Zhang W, Lin Z. In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(2):298–310.
 33. Klein M, Kuhn Y, Woelke E, Linde T, Ptock C, Kopp A, et al. In vitro study on the hemocompatibility of plasma electrolytic oxidation coatings on titanium substrates. *Artif Organs*. 2020 Apr;44(4):419–27.
 34. Zhou K, Xie F, Wu X, Wang S. Fabrication of High Temperature Oxidation Resistance Nanocomposite Coatings on PEO Treated TC21 Alloy. *Materials (Basel)*. 2019 Dec;13(1).
 35. Laurindo CAH, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Apr;37:223–31.
 36. Costa RC, Souza JGS, Cordeiro JM, Bertolini M, de Avila ED, Landers R, et al. Synthesis of bioactive glass-based coating by plasma electrolytic oxidation: Untangling a new deposition pathway toward titanium implant surfaces. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2020;579:680–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197972030847X>
 37. Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25(3):516–24.
 38. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2020 Aug 1;177(16):3617–24. Available from: <https://doi.org/10.1111/bph.15193>
 39. Silva AV da, Volpon JB. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato . Vol. 12, *Acta Ortopédica Brasileira* . scielo ; 2004. p. 22–31.
 40. Fan GY, Cherg JH, Chang SJ, Poongodi R, Wang CH, Wang YW, et al. Severe Burn Injury in a Swine Model for Clinical Dressing Assessment. *J Vis Exp*. 2018 Nov;(141).
 41. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris AL da S, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jun;26:e20170326.

42. Fabris AL da S, Mulinari-Santos G, Hassumi JS, Freire AR, Faverani LP, Gruber R, et al. Morphometric and histologic characterization of alveolar bone from hypertensive patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017 Dec;19(6):1106–13.
43. Bonardi JP, Pereira R dos S, Boos Lima FBDJ, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, et al. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76(2):325–35.
44. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1485–94.
45. Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LF de M, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, et al. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? *Membranes (Basel)*. 2020 Sep;10(9).
46. Bouxsein 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 Jul;25(7):1468–86.
47. Benetti F, Briso ALF, de Araújo Lopes JM, Carminatti M, Conti LC, Gallinari MO, et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. *Int Endod J*. 2019 Dec;52(12):1723–37.
48. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto R de C, et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents . Vol. 24, *Journal of Applied Oral Science* . scielo ; 2016. p. 95–104.
49. Pedrosa WFJ, Okamoto R, Faria PEP, Arnez MFM, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Nov;20(11):1254–64.
50. Manrique N, Pereira CCS, Luvizuto ER, Sánchez MDPR, Okamoto T, Okamoto R, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig*. 2015 Jul;19(6):1319–27.
51. Marques I da SV, da Cruz NC, Landers R, Yuan JCC, Mesquita MF, Sukotjo C, et al. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases [Internet]*. 2015;10(4):41002. Available from: <https://doi.org/10.1116/1.4932579>
52. da Silva Vieira Marques I, Barão VAR, da Cruz NC, Yuan JCC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci [Internet]*. 2015;100:133–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X15300160>
53. Liu J, Mohd Rafiq NB, Wong LM, Wang S. Surface Treatment and Bioinspired Coating for 3D-Printed Implants. *Front Chem [Internet]*. 2021 Nov 18;9:768007. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34869211>

54. Gouveia PF, Mesquita-Guimarães J, Galárraga-Vinueza ME, Souza JCM, Silva FS, Fredel MC, et al. In-vitro mechanical and biological evaluation of novel zirconia reinforced bioglass scaffolds for bone repair. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2021;114:104164. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616120307074>
55. Rohr N, Nebe JB, Schmidli F, Müller P, Weber M, Fischer H, et al. Influence of bioactive glass-coating of zirconia implant surfaces on human osteoblast behavior in vitro. *Dental Materials* [Internet]. 2019;35(6):862–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564118312867>
56. Pantulap U, Arango-Ospina M, Boccaccini AR. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2021 Dec 23;33(1):3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34940923>
57. Al-Harbi N, Mohammed H, Al-Hadeethi Y, Bakry AS, Umar A, Hussein MA, et al. Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. 2021 Jan 20;14(2):75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33498229>
58. Tanios M, Brickman B, Cage E, Abbas K, Smith C, Atallah M, et al. Diabetes and Impaired Fracture Healing: A Narrative Review of Recent Literature. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2022;20(5):229–39. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11914-022-00740-z>
59. Elamir Y, Gianakos AL, Lane JM, Sharma A, Grist WP, Liporace FA, et al. The Effects of Diabetes and Diabetic Medications on Bone Health. *J Orthop Trauma* [Internet]. 2020;34(3). Available from: https://journals.lww.com/jorthotrauma/Fulltext/2020/03000/The_Effects_of_Diabetes_and_Diabetic_Medications.14.aspx
60. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and Oral Implant Failure: A Systematic Review. *J Dent Res* [Internet]. 2014 Jun 13;93(9):859–67. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034514538820>

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do potencial osteoindutor de implantes e miniplacas com revestimento à base de vidro bioativo via oxidação por plasma eletrolítico na otimização do reparo ósseo em ratos diabéticos", Processo FOA nº 0298-2021, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Julho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Agosto de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the osteoinductive potential of implants and miniplates with bioactive glass-based coating via electrolytic plasma oxidation in the optimization of bone repair in diabetic rats", Protocol FOA nº 0298-2021, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 01, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 01, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
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 – Revista que objetivamos publicar – Biomaterials

<https://www.elsevier.com/journals/biomaterials/0142-9612/guide-for-authors>

