



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

SARAH DE OLIVEIRA MARCO AVELINO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RECOBRIMENTO DOS BIOVIDROS
BIOK E 45S5 NA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE ZIRCÔNIA:
*estudo in vitro e in vivo***

2022

SARAH DE OLIVEIRA MARCO AVELINO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RECOBRIMENTO DOS BIOVIDROS BIOK E 45S5
NA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE ZIRCÔNIA: estudo *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Biomateriais. Linha de pesquisa: Estudo da biocompatibilidade de novos materiais de uso médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Moreira Bastos Campos

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Avelino, Sarah de Oliveira Marco

Avaliação do efeito do recobrimento dos biovidros biok e 45S5 na superfície de implantes de zircônia: estudo in vivo e in vitro / Sarah de Oliveira Marco Avelino. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Luana Marotta Reis De Vasconcellos

Coorientador: Tiago Moreira Bastos Campos

1. Osteogênese. 2. Osseointegração. 3. Zircônia. 4. Biovidro. I. De Vasconcellos, Luana Marotta Reis, orient. II. Campos, Tiago Moreira Bastos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira

Universidade Braz Cubas

Faculdade de Odontologia

Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 17 de novembro de 2022.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por terem me concedido o privilégio de estudar nas melhores condições possíveis do Maternal à Pós-Graduação. Mais do que a possibilitar tantos acessos, a educação tem um papel transformador único que nos concede autonomia, possibilidades de escolhas e de mudanças na vida, muito obrigada por essa herança preciosa. Todas as minhas conquistas (pessoais e profissionais) sempre serão nossas, nunca conseguirei retribuir à altura tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês incondicionalmente.

Ao Léo, que me acompanhou desde o início e foi peça fundamental para que esse trabalho acontecesse de uma forma menos pesada. Sem dúvidas, essa dissertação é nossa, sou eternamente grata pela parceria e disponibilidade que teve em me ajudar em todos os momentos que precisei, ser sua co-orientadora foi um presente pra mim. Tenho certeza que sua dedicação em tudo que faz te conduzirá à caminhos brilhantes. Conte sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu sustento em todos os momentos, por tantas bênçãos a mim concedidas e por sempre guiar meu caminho.

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida. Mãe, pai, Felipe, amo vocês infinitamente, não consigo colocar em palavras tanto amor e gratidão. Estendo meus agradecimentos aos meus avôs e avós por serem bons exemplos e por me amarem tanto. Agradeço também as minhas tias e tios, por tudo que fizeram por mim, e por me darem meus primos que tanto amo. Minha família é a maior benção da minha vida.

À minha orientadora, profa. Luana, sou extremamente grata pela oportunidade de aprender e trabalhar com alguém tão competente. Muito obrigada pela parceira que, por muitas vezes, foi além do profissional. Tenho imensa admiração e respeito por sua trajetória. Obrigada por tudo ao longo desses 6 anos trabalhando juntas, sempre me lembrarei de você com carinho.

Ao Léo, meu querido aluno co-orientado, a quem também dedico esse trabalho e sou imensamente grata. Muito obrigada por me ajudar em todos os momentos que precisei. É um privilégio poder trabalhar com pessoas comprometidas, competentes e determinadas como você. Te desejo a colheita de tantos bons frutos que vem plantando em sua jornada. Mais do que um bom profissional, você já é uma excelente pessoa, e isso é o que mais importa.

Ao meu co-orientador, Tiago, pela parceria importante ao desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelo o que me ensinou nesse período de convivência e por ter me permitido enxergar outras possibilidades.

Às minhas amigas da vida: Luana, Lenira, Gabriela Trindade, Júlia, Gabriella Azevedo, Ana Gabriele, Bia Mendes, Bia Carreira, Giovanna Lotto, Giovanna Saroli,

Thamires, Thayná Brito, Thayná Lemos e Larissa, por terem incansavelmente me ouvido e apoiado durante essa fase (e em tantas outras). Não sei o que seria de mim sem vocês, sou infinitamente grata por nosso encontro. Obrigada pela paciência e por tanto amor. Desejo de todo o coração que possamos estar sempre juntas.

Às pessoas especiais que entraram em minha vida nesse período difícil, e que indiretamente me ajudaram muito, tornando essa fase mais leve, dividindo bons momentos, boas conversas, e me fazendo mais feliz: Ricardo, Stephanie, Vitória, Flávia, Verônica, Raíssa, muito obrigada. Ter vocês comigo me deu ânimo e alegria para fazer o que precisava ser feito.

Às amigas que o mestrado me deu, em especial à Marina, que foi meu braço direito em muitos dias de laboratório e biotério, sempre pronta para me ajudar, ouvir e compartilhar bons momentos. Obrigada Ma, teria sido muito mais difícil sem você. Estendo os agradecimentos à Bia e Tainá, que dividiram a graduação e o mestrado comigo. Foi uma alegria enorme ter me aproximado ainda mais de vocês.

À todos os orientados da professora Luana, pela ótima convivência que tivemos e por toda ajuda e suporte no desenvolvimento dessa pesquisa. Trabalhar com um grupo comprometido, responsável e leve faz toda diferença. Juliani, Mari, Ju Lupp, Thays, Bia, Júlia, Vini, Hugo, Léo: muito obrigada por tudo que compartilhamos, vou sempre me lembrar com muito carinho de cada um de vocês.

Ao ICT-UNESP São José dos Campos, por ter sido minha casa por quase 7 anos, me oportunizando ter uma profissão e acesso à educação pública e de extrema qualidade. Sou muito feliz por ter escolhido essa instituição e me orgulho muito de minha formação.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB) e todos os seus funcionários técnico-administrativos e docentes que me acompanharam ao longo do mestrado. Todos vocês foram essenciais para que essa

dissertação acontecesse. Agradeço em especial à Carla, ao Sérgio e ao André pelo suporte em todos os momentos que precisei.

Ao Instituto de Ciência e Tecnológica (ITA) pela parceria que firmamos, disponibilidade de utilização dos laboratórios e equipamentos, fundamentais para realização desse trabalho. Estendo o agradecimento ao professor Gilmar Tim, que gentilmente me acolheu e cedeu todos esses espaços.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa no período de Agosto de 2021 à Agosto de 2022.

À todos os animais utilizados nessa pesquisa, minha sincera gratidão.

"Faça o melhor que você pode, nas condições que você tem, enquanto não tiver condições de fazer melhor ainda". Mario Sérgio Cortella

RESUMO

Avelino SOM. Avaliação do efeito do recobrimento dos biovidros biok e 45s5 na superfície de implantes de zircônia: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

O estudo avaliou o efeito do recobrimento de biovidros 45S5 e bioK na superfície de implantes de zircônia na osteogênese *in vitro* e na osseointegração *in vivo*. Para isso, foram confeccionadas amostras de zircônia T (Tosho, Japão) que foram divididas em 3 grupos: zircônia polida (Z); zircônia recoberta com biovidro 45S5 (45); zircônia recoberta com biovidro biok (bk). As amostras produzidas para os testes de caracterização e etapa *in vitro* mediram 6,0 x 4,0 mm, enquanto que para a etapa *in vivo* apresentaram 2,5x 2,5mm de altura. Após a produção, a morfologia das superfícies das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estas foram submetidas ao teste de rugosidade média (Ra). Posteriormente à caracterização, as amostras foram submetidas aos testes biológicos *in vitro* e *in vivo*. Na etapa *in vitro* células mesenquimais obtidas de fêmures de ratos foram isoladas e plaqueadas com as amostras visando avaliar a influência destas na morfologia, atividade e diferenciação celular de osteoblastos, utilizando os testes biológicos de citotoxicidade, avaliação do conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização. Na etapa *in vivo* 18 ratos foram submetidos à cirurgia para colocação dos implantes nas tíbias direitas e esquerdas, os quais receberam implantes do mesmo material, conforme os grupos descritos acima. Os animais foram eutanasiados após 4 semanas do procedimento cirúrgico. As tíbias direitas foram submetidas à análise histológica e histomorfométrica, enquanto as tíbias esquerdas foram submetidas ao teste de *push out*. Com os resultados *in vitro* pudemos observar que os grupos experimentais não foram citotóxicos, propiciaram um ambiente adequado à atividade e diferenciação celular, e ainda permitiram o espreado celular sobre as amostras. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais nas análises *in vivo*. Concluiu-se que os recobrimentos nos implantes de zircônia com os biovidros 45S5 e biok foram produzidos adequadamente e permitiram a atividade e diferenciação celular, bem como neoformação óssea ao redor dos implantes. Novos estudos devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre o comportamento do recobrimento dos biovidros na superfície de implantes de zircônia.

Palavras-chave: osteogênese; osseointegração; zircônia; biovidro.

ABSTRACT

Avelino SOM. Evaluation of the effect of coating biok and 45S5 bioglasses on the surface of zirconia implants: in vitro and in vivo study. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

The study evaluated the effect of bio-glass 45S5 and bioK coating on zirconia implant surfaces on in vitro osteogenesis and in vivo osseointegration. For this purpose, zirconia T (Tosho, Japan) samples were made and divided into 3 groups: polished zirconia (Z); zirconia coated with bioglass 45S5 (45); zirconia coated with biok (bk). The samples produced for the characterization tests and in vitro stage measured 6.0 x 4.0 mm, while for the in vivo stage they were 2.5x 2.5 mm in height. After production, the surface morphology of the samples was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and they were submitted to the average roughness test (Ra). After characterization, the samples were submitted to in vitro and in vivo biological tests. In the in vitro stage mesenchymal cells obtained from rat femurs were isolated and plated with the samples to evaluate their influence on osteoblast morphology, activity and cell differentiation, using the biological tests of cytotoxicity, total protein content, alkaline phosphatase activity and mineralization nodule formation. In the in vivo stage 18 rats underwent surgery to place the implants in the right and left tibiae, which received implants of the same material, according to the groups described above. The animals were euthanized 4 weeks after the surgical procedure. The right tibiae were subjected to histological and histomorphometric analysis, while the left tibiae were subjected to the push out test. With the in vitro results we could observe that the experimental groups were not cytotoxic, provided an adequate environment for cell activity and differentiation, and also allowed cell spreading over the samples. No statistically significant differences were observed between the experimental groups in the in vivo analyses. It was concluded that the coatings on zirconia implants with 45S5 and biok bioglass were adequately produced and allowed cell activity and differentiation, as well as bone neoformation around the implants. Further studies should be carried out to provide additional information on the coating behavior of bio glasses on the surface of zirconia implants.

Keywords: osteogenesis; osseointegration; zirconia; bioglass.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3 PROPOSIÇÃO	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Confecção das amostras e dos implantes	19
4.2 Caracterização das amostras	21
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	22
4.3.1 Isolamento e cultura de células mesequimais	22
4.3.2 Determinação da viabilidade celular	22
4.3.3 Análise do conteúdo de proteína total	22
4.3.4 Atividade de fosfatase alcalina	22
4.3.5 Análise de formação de nódulos de mineralização	22
4.4 Experimentos <i>in vivo</i> com modelo experimental proposto	22
4.4.1 Animais.....	27
4.4.2 Cirurgia de confecção dos defeitos ósseos.....	27
4.5 Metodologia de análises	27
4.5.1 Teste de <i>push out</i>	27
4.5.2 Análise histológica e histomorfométrica.....	31
4.5.3 Análise estatística	32
5 RESULTADO	33
5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
5.2 Análise de rugosidade superficial.....	36
5.3 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	37
5.3.1 Determinação da viabilidade celular.....	37
5.3.2 Conteúdo de proteína total	38
5.3.3 Análise de fosfatase alcalina.....	39
5.3.4 Formação de nódulos de mineralização.....	40
5.4 Análise histológica.....	41
5.5 Análise histomorfométrica	43
5.6 Teste de <i>push out</i>	44

6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	59

1 INTRODUÇÃO

Implantes de zircônia têm se mostrado uma alternativa promissora aos implantes de titânio por exibirem similar desenvolvimento da osseointegração além de promoverem melhor adaptação dos tecidos moles e otimizarem a estética (Sivaraman et al., 2018). Adicionalmente, as superfícies de implantes de zircônia mostraram uma redução estatisticamente significativa na formação de biofilme de placa humana após 72 horas de incubação em um modelo experimental quando comparadas com superfícies de implantes de titânio (Roehling et al., 2017). Assim, além de suprir as desvantagens associadas ao implante de titânio, como descoloração do tecido peri-implantar e possibilidade de hipersensibilidade, na revisão recente de Masao Yoshinari (2020), observou-se que os implantes de zircônia apresentam aspectos mecânicos e biológicos com desempenhos compatíveis ao apresentado pelo implante de titânio.

A zircônia é um material polimórfico que apresenta três diferentes formas cristalográficas as quais são dependentes da temperatura, sendo elas: monoclinica (M), tetragonal (T) e cúbica (C) (Kelly, Denry, 2008). A transformação de fase tetragonal para fase monoclinica é responsável pela melhora nas propriedades mecânicas e pelo notável desempenho da zircônia, característica já explorada para aplicações médicas e também na engenharia (Ramos et al., 2019; Roy et al., 2019). Schünemann et al. (2019) ainda concluíram que superfícies de zircônia modificadas com recobrimentos diversos podem apresentar osseointegração mais rápida do que em superfícies não tratadas.

Recobrimentos bioativos em superfícies de zircônia possuem capacidade de induzir a formação de hidroxiapatita, essencial para posterior proliferação óssea (Schünemann et al., 2019), além de proporcionarem área de gradação estrutural. Materiais com gradação funcional possuem variações das suas fases estruturais dentro do próprio material, gerando diferenças graduais em suas propriedades (Bohidar et al., 2014). A transição progressiva entre uma camada de vidro externa e a zircônia subjacente permitiu uma estrutura de bulk do material inteiramente de grãos de zircônia (Campos et al., 2016). Essa transição gradativa dos módulos elásticos em direção ao bulk resultou em uma cerâmica de alta resistência às forças

de flexão que conduzem a supressão dos danos de contato, quando esse material é utilizado em fins odontológicos diversos (Zhang et al., 2009). O recobrimento da zircônia com biovidro tornou este material mais resistente, e também possibilitou o uso da zircônia sem a necessidade de estratificação (Zhang et al., 2012).

Vidros bioativos são materiais utilizados para desenvolver biomateriais mais direcionados para aplicações médicas, tais como dispositivos de implantes para o corpo humano visando reparar e substituir ossos doentes ou danificados devido à sua excelente bioatividade e biocompatibilidade (Aguilar-Reyes et al., 2012; Albulescu et al., 2019; Ioannou et al., 2015). No entanto, ao contrário de suas excelentes características de bioatividade, esses biomateriais apresentam baixa resistência mecânica, como tenacidade à fratura, em comparação com o osso natural (Charlotte Schausten et al., 2010). Contudo, quando associado a outros materiais, os biovidros são capazes de auxiliar na melhora das propriedades mecânicas destes (Jia et al., 2011). O biovidro 45S5 apresenta bioatividade, osteoestimulação e osteocondução satisfatórias, entre outras propriedades importantes para a regeneração óssea (Aguilar-Reyes et al., 2012; Ioannou et al., 2015).

Na busca por melhores propriedades mecânicas, a substituição do Na_2O pelo K_2O na estrutura química do 45S5 deu origem ao biok, um biovidro experimental. A presença do óxido de potássio contribuiu para melhorar a resistência da matriz, contribuindo para que o biok apresente melhores propriedades mecânicas que o biovidro 45S5 (Bellucci et al., 2010; Bellucci et al., 2011; Cannillo et al., 2009; Rahaman et al., 2006).

Neste contexto o desenvolvimento de um novo recobrimento para a superfície da zircônia, tem por objetivo combinar a bioatividade dos vidros, sem afetar a estética desta, que é uma propriedade desejável na odontologia para as situações clínicas principalmente de dentes anteriores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os materiais cerâmicos além de serem estéticos apresentam desempenho adequado a longo prazo, e devido a estas características, têm sido amplamente utilizados na odontologia restauradora (Zhang et al., 2017). Dentre essas, a zircônia se destaca devido ao seu alto valor de tenacidade à fratura, excelentes propriedades mecânicas e adequada estabilidade química e dimensional (Kaizer et al., 2017; Zang et al., 2018; Yan et al., 2018).

Contudo, materiais que exibem uma bicamada composta por zircônia e cerâmica de revestimento, apresentam limitações, sobretudo relacionadas à incompatibilidade nos coeficientes de expansão e baixa condutividade térmica da zircônia. Por isso, para que esse material conquiste estabilidade e resistência em temperatura ambiente, faz-se necessária a adição de um óxido dopante (De Araújo-Júnior et al., 2020). Assim a zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio (Y-TZP) tem sido utilizada em aplicações odontológicas (Chevalier et al., 2007).

As fases microestruturais observadas na zircônia se organizam em 3 fases distintas: monoclinica (M), cúbica (C) e tetragonal (T). A transição entre as fases cristalinas citadas ocorre, sobretudo, por uma alteração de temperatura na superfície da zircônia, provocando uma mudança volumétrica no cristal onde a tensão é aplicada (Manicone et al., 2007).

Além das propriedades mecânicas satisfatórias da zircônia, Gautam et al. (2016) revisaram a literatura para discorrer, dentre outros pontos, sobre a biocompatibilidade da zircônia. Nessa revisão sistemática, trabalhos *in vivo* e *in vitro* comprovaram que essa cerâmica (Y-TZP) é biocompatível, não tendo sido relatada nenhuma reação adversa local ou sistêmica grave relacionada a este material. Soma-se a isso, estudos apresentados nesta revisão que demonstraram menor acúmulo de bactérias ao redor da zircônia Y-TZP quando comparada ao titânio, o que foi relacionado, sobretudo, as diferentes propriedades de adsorção de proteínas dos materiais.

Degidi et al. (2006) realizaram um estudo *in vivo* para avaliar e comparar a reação dos tecidos moles ao redor da zircônia e do titânio. Os resultados demonstraram maior taxa de processos inflamatórios bem como de mediadores químicos ao redor do titânio. Piconi e Maccauro (1999) ao revisarem a literatura a

fim de investigar as propriedades e aplicações da zircônia, concluíram com relação às propriedades biológicas que o material não apresentou efeitos citotóxicos.

Implantes de titânio osseointegrados são considerados efetivos como tratamento reabilitador, uma vez que são altamente previsíveis e apresentam alto índice de sucesso (Klokkevold et al., 2007). Entretanto, podem exibir aspecto acinzentado ao redor do seu contorno, sendo que os pilares metálicos têm sido associados a importantes limitações estéticas, principalmente em dentes anteriores e associados a características particulares do paciente, como o biotipo periodontal fino (Linkevicius et al., 2008; Linkevicius et al., 2015; Sailer et al., 2007; Zembic et al., 2009). A utilização de pilares totalmente cerâmicos, nos quais cerâmicas policristalinas de alta resistência são mais indicadas, possibilita alcançar uma melhora significativa na estética em situações de reabilitação com implantes em dentes anteriores (Guess et al., 2011).

Amplamente utilizada em Odontologia, a zircônia Y-TZP apresenta cor branca e translucidez semelhante aos dentes naturais, enquanto o titânio quando implantado faz com que o tecido mole tenha uma aparência acinzentada (Sivaraman et al., 2018). Essa zircônia pode ser utilizada em diferentes condições estruturais, tanto em coroas como em pilares de implantes. Diversos estudos presentes na revisão de Hanawa (2020) demonstraram que os implantes de zircônia apresentam osseointegração comparável aos implantes de titânio, apresentando taxas de aposição óssea e respostas celulares semelhantes em ambos os materiais.

Apesar de apresentarem características biológicas que indicam interação adequada do material com o corpo, a zircônia tem sido considerada como um material bioinerte (Yin et al., 2017). Visando driblar essa característica do material e melhorar as propriedades biológicas e o comportamento de osseointegração, foram desenvolvidos métodos físico-químicos de tratamento nesta superfície de cerâmica, tais como: jateamento, tratamento a laser, microusinagem, além do desenvolvimento de revestimentos associados ou não com moléculas bioativas (Bacchelli et al., 2009).

Em engenharia tecidual, vários métodos têm sido investigados para fabricação de materiais que interajam com os tecidos circundantes e sejam bioativos, incluindo a incorporação de cargas e os revestimentos biocerâmicos (Causa et al., 2006; Hench et al., 2000; Shin et al., 2003). Diferentes revestimentos têm sido

desenvolvidos para aumentar a bioatividade potencial antibacteriano e a bioatividade das zircônias. Revestimentos bioativos sobre superfícies de zircônia auxiliam a indução de formação de hidroxiapatita no ambiente biológico, fundamental para que ocorra a neoformação óssea (Schünemann et al., 2019).

Os vidros bioativos são exemplos de biomateriais capazes de induzir uma resposta biológica *in vivo* que resulte na formação de uma interação satisfatória entre o material e o tecido (Hench, 1998). Dentre suas potencialidades, os vidros bioativos são capazes de aumentar a ligação com tecido ósseo quando em contato com fluidos fisiológicos, por meio da formação de uma camada de hidroxiapatita semelhante à fase mineral presente no osso (Jones, 2015).

O biovidro 45S5 é um vidro bioativo considerado padrão ouro em sua classe devido a sua alta bioatividade (Jones, 2015), além de apresentar excelentes propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade. Aliado a isso, apresenta uma capacidade particular de ligação a tecidos moles e duros (Hench, 1999) e estudos têm demonstrado que produtos de sua dissolução estimulam a expressão gênica em células osteoblásticas e a angiogênese (Day et al., 2004; Hench, 2000).

Recentemente, Gouveia et al. (2021) relataram resultados promissores com relação a bioatividade e viabilidade celular de amostras de zircônia recobertas com vidro quando comparada à zircônia monolítica, sem recobrimento de vidro. A etapa *in vitro* deste estudo utilizou a linhagem celular MG63, que em amostras incorporadas com o biovidro 58S apresentaram viabilidade celular mais satisfatória do que as amostras de zircônias sem esse recobrimento. Entretanto, esse biomaterial apresenta como uma de suas limitações a baixa resistência mecânica, que impede sua aplicação para usos em alta pressão (Gutierrez et al., 2006).

Visando uma melhora na resistência e maior possibilidade de aplicações, tem se buscado desenvolver novos biovidros cerâmicos que mantenham as propriedades osteocondutoras do 45S5 apresentado propriedades mecânicas mais satisfatórias (Gutierrez et al., 2006). Uma alteração na estrutura química do 45S5, visando reduzir sua tendência a cristalizar em alta temperatura, deu origem ao biok, um biovidro experimental, que promete superar as propriedades mecânicas de seu precursor, devido a presença de óxido de potássio em sua composição (Canillo et al., 2011).

Canillo e Sola (2010) compararam as técnicas de esmaltação e de pulverização de plasma para produzir revestimentos cerâmicos com biovidros ativos, sendo eles o 45S5 e o biok. Os autores descreveram que a capacidade de limitar a cristalização descontrolada durante o processo de produção do recobrimento pode ser considerada uma vantagem do biok com relação ao 45S5. Contudo, apontam a necessidade de estudos direcionados para investigação da bioatividade desse vidro como forma de revestimento.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral neste estudo foi avaliar a influência do recobrimento dos biovidros 45S5 e biok na superfície de implantes de zircônia na atividade e diferenciação de células mesenquimais, bem como na osseointegração destes em tíbias de ratos, visando aplicação odontológica.

Os objetivos específicos foram avaliar os implantes de zircônia, recobertos com os diferentes biovidros quanto:

- a) ao processo de síntese e caracterização;
- b) a influência na atividade e diferenciação celular;
- c) a influência na osseointegração ao tecido ósseo;

Foram objetivos específicos também a comparação dos resultados:

- a) da etapa *in vitro* com a etapa *in vivo* para cada material;
- b) do grupo do biovidro 45S5 com o grupo do biovidro biok.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Confeção das amostras e dos implantes

As amostras foram obtidas a partir de zircônia Zpex (Tosho, Japão) em pó, que foram prensadas com 3 toneladas em formato de discos, e posteriormente sinterizadas a 1550°C por duas horas. Essas amostras foram confeccionadas no Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, sob orientação da Prof. Dr. Tiago Moreira Bastos Campos. Já os implantes, foram confeccionados a partir de blocos de zircônia Zpex (Tosho, Japão), que foram cortados em formato cilíndrico na cortadora de espécimes circulares (MicroMill, Laboratório 1 Odontologia Restauradora ICT Unesp). Posteriormente, os cilindros obtidos foram lixados com lixas de diferentes granulações até chegarem à espessura desejada. As dimensões finais das amostras foram de 6,0 x 4,0 x 1,6 mm³ para a caracterização dos materiais e etapa *in vitro*, enquanto exibiram 2,5 x 2,5 mm para a etapa *in vivo*. Neste momento as amostras e os implantes foram divididos em 3 grupos baseado no recobrimento que receberam: zircônia (z); zircônia recoberta com biovidro 45S5 (45); zircônia recoberta com biovidro biok (bk).

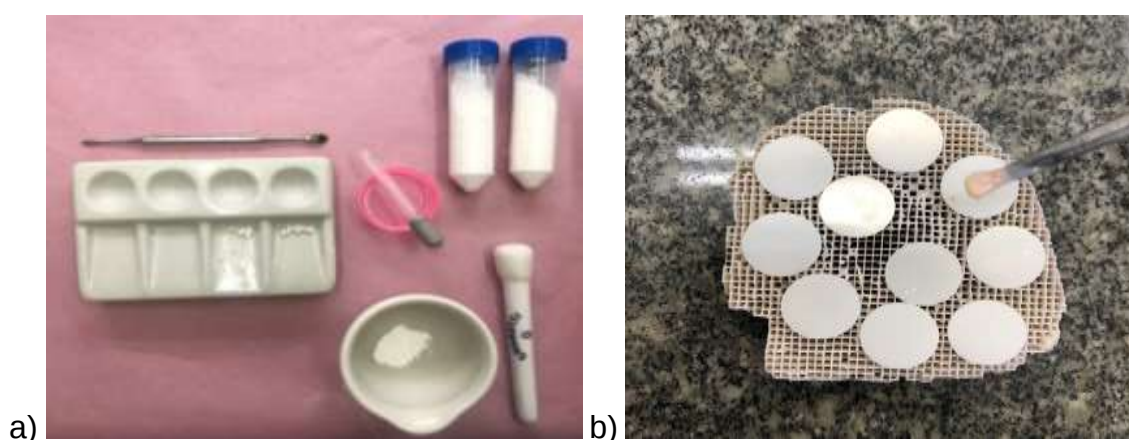
Os vidros foram produzidos no laboratório de plasmas e processo (LPP) no Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) sob a responsabilidade do Pesq. Tiago Moreira Bastos Campos. A fabricação do vidro 45S5 foi realizada da seguinte maneira: o ácido silícico foi obtido pela passagem de metassilicato de sódio (Na₂SiO₃·5H₂O) em solução aquosa (10% m/m) utilizando uma resina de troca iônica (IR120 – Rohm and Haas). A seguir, foram adicionados sais (nitratos) com para gerar as composições dos vidros. Esse líquido foi colocado em uma estufa a 100°C por 24 horas. Após essa etapa, esses pós foram calcinados a 600°C por 1 hora para a formação dos vidros (Campos et al., 2016).

A produção do biok foi realizada pelo mesmo processo substituindo os íons Na₂O pelo K₂O na estrutura química do biovidro 45S5 descrita acima.

O recobrimento das amostras pelos vidros foi realizado na superfície de trabalho das amostras pré-sinterizadas para o estudo *in vitro* e ao redor de todo o implante para a etapa *in vivo* (Figura 1) por meio de uma aplicação única com pincel

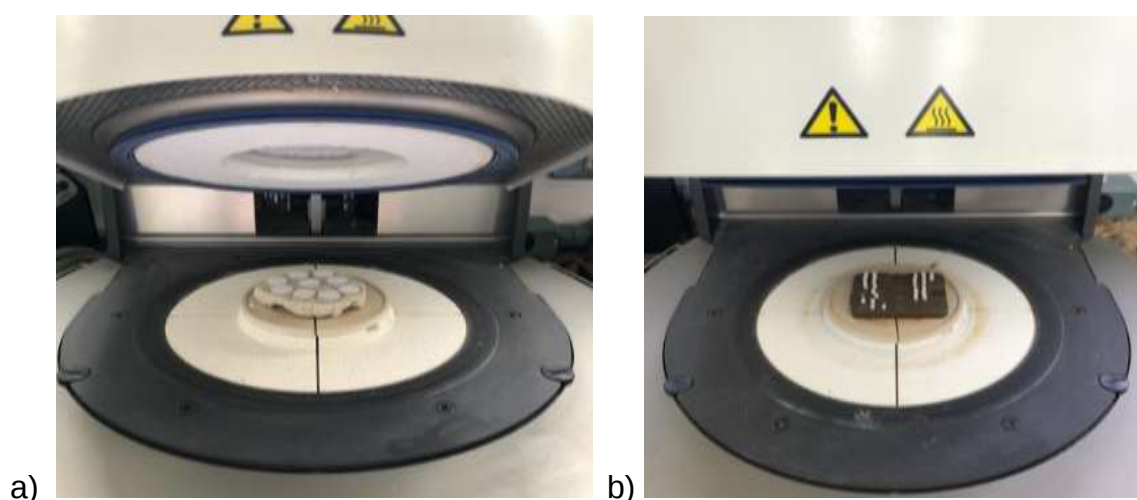
fino em uma proporção de 0,1g de pó para 8 gotas de propilenoglicol P.A.-A.C.S. (LABSynth Produtos para Laboratório Ltda.) mensurados em conta-gotas. Em seguida, as amostras foram sinterizadas em forno Vita Zyrcomat (VITA Zahnfabrik) a 1550 °C (Figura 2) seguindo o protocolo: temperatura inicial 25°C, taxa de aquecimento de 17 °C/min, temperatura de queima de 1550 °C e tempo de queima de 120 min.

Figura 1 – Aplicação dos biovidros



Legenda: a) Preparo dos materiais para aplicação do biovidro nas amostras do in vivo; b) Aplicação do biovidro com propilenoglicol na superfície das amostras confeccionadas para a etapa *in vitro*.
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2 – Sinterização das amostras no forno Vita Zyrcomat



Legenda: a) Amostras para testes *in vitro*; b) Amostras para testes *in vivo*.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Caracterização das amostras

Para analisar a topografia superficial das amostras, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “Field Emission Gun” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca). Para isso, 3 amostras de cada grupo foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (*stub*), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado por vaporização iônica (*sputtering*) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, *Sputter Coater*, *Quorum Technologies*, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 mA em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3,5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado (BSE). As magnificações utilizadas foram de 1.000 X, 5.000 X e 10.000X.

A rugosidade de superfície foi analisada na superfície de trabalho de 5 amostras, nos parâmetros Ra (rugosidade média absoluta das alturas das irregularidades ao longo do perfil; parâmetro de altura), RSm (espaçamento ou largura média do perfil das irregularidades dentro de um comprimento de amostragem; parâmetro híbrido) e RZ (profundidade da rugosidade média) (Wennerberg and Albrektsson, 2000). As amostras foram individualmente identificados e na superfície de cada uma (4,0 x 4,0 mm) realizadas leituras (3 mm) da rugosidade tridimensional por meio de um rugosímetro (Surftest SJ 400, Mitutoyo, Tóquio, Japão). Foram realizadas três leituras paralelas equidistantes com velocidade de varredura de 0,2 mm/s, seguindo a norma ISO 4287-1997, com filtro Gaussian e o valor cut-off de 0,8 mm, e foram realizadas mais três leituras paralelas com amostra movimentada em 90° nos mesmos parâmetros descritos acima (Figura 3).

Figura 3 – Análise da rugosidade de superfície na amostra do grupo 45S5



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Experimentos *in vitro*

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob o número 07/2021 (Anexo A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (Animal Research Reporting of In Vivo Experiments) (Percie Du Sert et al., 2020).

4.3.1 Isolamento e cultura de células mesenquimais

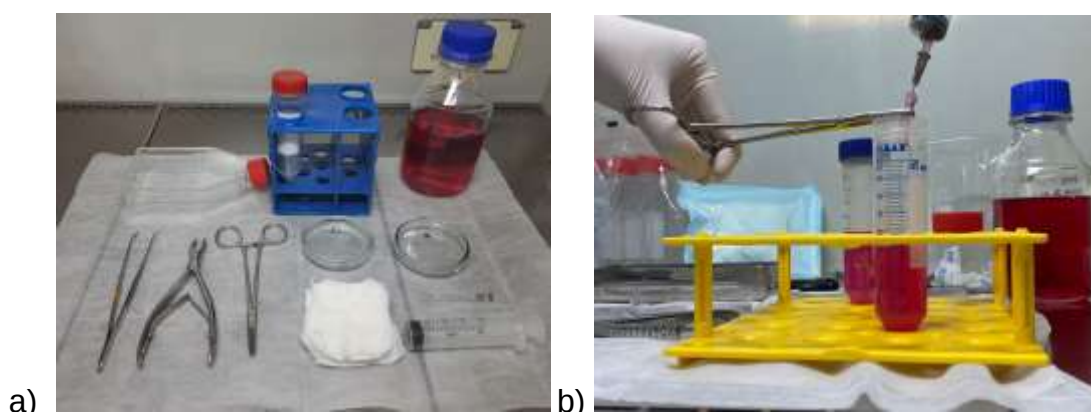
Nove ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), pesando cerca de 300g com 90 dias de idade foram utilizados para a etapa *in vitro* deste projeto. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT/Unesp em gaiolas onde

receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20°C e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas.

As células foram obtidas dos fêmures desses ratos de acordo com Maniopoulos et al. (1988) com adaptações. O método de eutanásia utilizado foi por meio de dose excessiva da solução anestésica, na qual foi administrada tripla dose via intramuscular da solução anestésica de Xilazina/Ketamina para realização do procedimento cirúrgico, seguida de guilhotina. Após a remoção e limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA).

No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura suplementado contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e 1% de gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA) (Figura 4). Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brazil) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany).

Figura 4 – Isolamento celular



Legenda: a) material utilizado para o isolamento celular dentro do fluxo laminar; b) lavagem do conteúdo da medula óssea com meio de cultura suplementado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células viáveis em poços da microplaca de 24 poços (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil). Previamente ao plaqueamento, foram preparadas amostras de acordo com os grupos citados anteriormente: zircônia polida (Z); zircônia recoberta com biovidro 45S5 (45); zircônia recoberta com biovidro biok (bk) as quais foram inseridas no interior dos poços para ocupar a área relativa ao diâmetro do poço. Em seguida, foi acrescentado 1mL de meio de cultura osteogênico na placa, que foi produzido a partir da adição de 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil) e 2,16g de β glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) na solução de 500 mL do meio de cultura celular suplementado citado acima. O grupo controle do experimento foi representado por meio do plaqueamento apenas das células no poço da placa, sem qualquer biomaterial no poço. O meio de cultura osteogênico foi trocado a cada 3 dias.

Após estes procedimentos, todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento dos testes. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicata, sendo que cada triplicata foi um *pool* de células provenientes dos fêmures de 3 animais de cada grupo. Os procedimentos para as análises propostas a seguir, estão detalhadamente descritas nos artigos prévios do nosso grupo de pesquisa (Andrade et al., 2015; Prado et al., 2018).

4.3.2 Determinação da viabilidade celular

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenilcarboximetil] (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) utilizando análise espectrofotométrica do corante incorporado, como controle negativo foi usado o fundo da placa. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após o período de 7 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os dados foram aferidos como absorbância e expressos como porcentagem sendo o grupo controle negativo considerado 100%.

4.3.3 Análise do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 7 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS e preenchidos com 150µL de laurel sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Aldrich, Chemical, St Louis, USA) para extração de proteínas. Em seguida, foi adicionado em cada poço 100µL de Lowry (Sigma Aldrich, Chemical, St Louis, USA) e a esta mistura acrescentou-se 100µL de Folin e Ciocalteu (Sigma Aldrich, Chemical, St Louis, USA) por poço. Após a finalização do teste, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 590 nm, sendo que o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/mL.

4.3.4 Atividade da fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil), utilizando os mesmos lisados do teste da proteína total após o

período de 7 dias. Às soluções do *kit* foram acrescentadas às alíquotas de 50µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C em banho-maria. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/hora/µg proteína.

4.3.5 Análise de formação de nódulos de mineralização

Após o período determinado de 7 dias foi verificada a formação de nódulos de mineralização utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA). Para isso, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse processo, as amostras passaram por um processo de desidratação com álcool previamente a coloração com o corante citado acima, por 10 minutos. Posteriormente as formações dos nódulos de mineralização foram observadas ao microscópio (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany).

4.4 Experimentos *in vivo* com o modelo experimental proposto

4.4.1 Animais

Esta etapa do projeto foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP e aprovada sob o número (Anexo A), sendo realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie Du Sert et al., 2020).

Dezoito ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando cerca de 300g com 90 dias de idade foram utilizados para a etapa *in vivo* deste projeto. Os animais

foram provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT/Unesp em gaiolas onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20°C e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas.

4.4.2 Cirurgia de confecção dos defeitos ósseos

Inicialmente os animais foram anestesiados via intramuscular com a combinação de 100mg/kg de Ketamina via intramuscular (Vetaset – FortDogde Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Xilazina – Coopers, Brasil, Ltda). A seguir os locais cirúrgicos das tíbias direitas e esquerdas foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com solução de álcool iodado. A incisão, com cerca de 2,5 mm, foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região distal da tíbia. Os tecidos foram divulsionados para expor as corticais, nas quais foram confeccionados os defeitos de 2,5mm, um em cada tíbia, sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, para evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Para obter este defeito, foram utilizadas brocas esféricas de 2,5 mm de diâmetro (Figura 5).

Após a confecção dos defeitos ósseos, as lojas cirúrgicas direitas e esquerdas foram preenchidas com o mesmo material, que foi selecionado no momento cirúrgico, fazendo com que os animais fossem alocados aleatoriamente nos grupos: zircônia polida (z); zircônia recoberta com biovidro 45S5 (45); zircônia recoberta com biovidro biok (bk). O grupo controle foi considerado o implante de zircônia polida. Em todos os defeitos, os tecidos foram reposicionados e as camadas foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson). Novamente foi realizada anti-sepsia com álcool iodado.

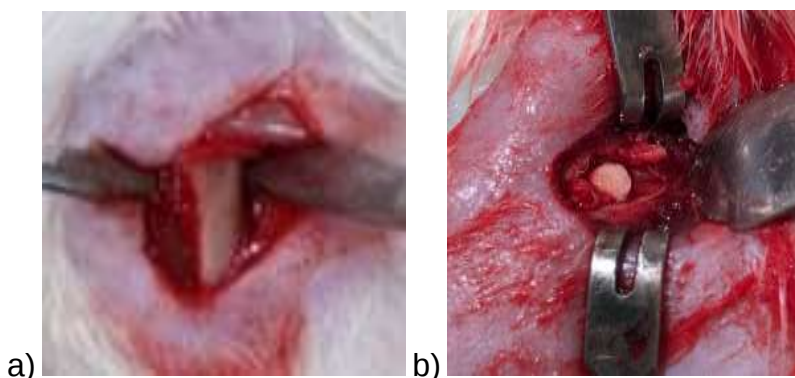
Previamente a cirurgia, foi administrado um fármaco analgésico cloridrato de tramadol, 8-10 mg/kg, por via oral, e esta medicação continuou a cada 12 h, durante 05 dias após a cirurgia. Foi administrado também o antibiótico Pentabiótico 0,01 mL/100g via intramuscular, imediatamente após a cirurgia e após 5 dias. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas, com ração *ad libitum* e água, em ambiente

com exaustão do ar, e monitorados até o período da eutanásia de 4 semanas (Bautista et al., 2019; Dos Santos Trento et al., 2020; Fang et al., 2015).

O método de eutanásia utilizado foi a dose excessiva da solução anestésica, na qual foi administrada tripla dose via intramuscular da solução anestésica anteriormente citada para realização do procedimento cirúrgico, seguida de guilhotina.

Após a eutanásia dos animais, as tíbias foram acondicionadas em recipientes contendo solução Ringer e formol a 10%, divididas em direitas e esquerdas respectivamente, identificadas de acordo com os grupos experimentais propostos. As tíbias direitas foram mantidas congeladas até o momento de preparo para realização do teste mecânico, enquanto as esquerdas permaneceram em temperatura ambiente no formol até serem preparadas para descalcificação.

Figura 5 – Procedimento cirúrgico



Legenda: a) Área da tíbia exposta para confecção da loja cirúrgica; b) Implante posicionado na loja cirúrgica.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Metodologia de análises

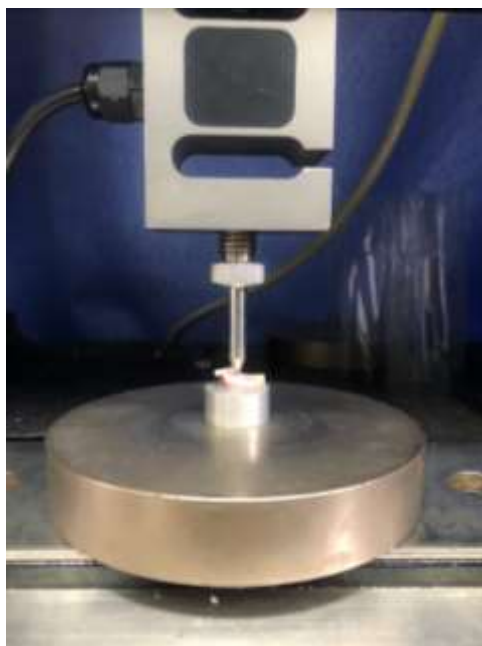
4.5.1 Teste de *push out*

No momento do teste, as tíbias direitas foram descongeladas naturalmente visando evitar alterações teciduais e em seguida foram cortadas e adaptadas ao dispositivo utilizado. Posteriormente os implantes foram expostos e submetidos ao teste de *push out* utilizando a máquina EMIC (modelo DL-1000). Nesta máquina, uma célula de carga de 100 kg foi aplicada uma força no centro do implante, paralela ao seu longo eixo (Figura 6). Para cada tíbia do animal analisado foi gerado um gráfico que indicou o nível de força aplicada para ocorrer o deslocamento do implante. A força necessária para deslocar os implantes foi mensurada e os valores registrados foram aqueles referentes ao valor máximo para a remoção do implante.

Além disso, foram obtidas as medidas da espessura da cortical óssea em que o implante estava posicionado previamente a realização do teste e posteriormente foi calculada a altura média (hm). Em seguida os valores foram inseridos em duas fórmulas (Figuras 7 e 8) subsequentes para se obter o valor da força de deslocamento (tensão - σ) desejada.

Os dados dessa análise foram submetidos à análise estatística descritiva. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

Figura 6 – Teste de *push out*



Legenda: Célula de carga aplicando força no implante.
 Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7 – Fórmula utilizada para cálculo da área de inserção dos implantes

$$\text{Área} = 2\pi r^* \times \text{altura média (h}_m\text{)}$$

r^* : raio do implante

Fonte: Vasconcellos, 2005.

Figura 8 – Fórmula utilizada para cálculo da tensão de remoção dos implantes

$$\text{Tensão média } (\sigma_m) = \frac{\text{força (F)}}{\text{área média (A}_m\text{)}}$$

Fonte: Vasconcellos, 2005.

4.5.2 Análise histológica e histomorfométrica

Para o preparo histológico foi utilizada a técnica de desgaste adaptada por Vasconcellos et al., 2008, que está descrita a seguir. Após o período de fixação do fragmento em formol, este foi lavado em água corrente por 24 horas e posteriormente submetido a concentrações crescentes de álcool de 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, para desidratação. O tecido ósseo com o material implantado foi incluído em solução de resina constituída por 85% de metil-metacrilato + 15% de dibutil (100ml) + 3g de peróxido de hidrogênio. A resina preparada foi colocada em potes de vidros. O material obtido da inclusão foi preso na morsa do aparelho de corte para tecido duro Labcut 1010 (EXTEC). Foi utilizado para o corte um disco diamantado de 4" (EXTEC – 12205). Os cortes obtidos foram embutidos em lâminas de resina plexiglass para que fossem desgastados até a espessura de 15µm para observação em microscopia óptica.

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas imaturas e a maturação óssea. Os cortes foram fotografados utilizando microscópio de luz ZeissAxioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canon, modelo Power Shot A640.

A análise histomorfométrica da neoformação óssea foi realizada por meio da captura de imagem de dois campos correspondentes a interface mesial e distal do implante em cada lâmina. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 5x, sob um foco fixo, acoplado com uma câmera AxioCam MRC 5 (Zeiss). Após captura, as imagens digitalizadas foram submetidas à análise histomorfométrica no *software Image J (Image Processing, and Analysis in Java, NIH, EUA)* e foi analisada a porcentagem de contato do implante com o tecido ósseo, BIC (*bone implant contact*) em cada um dos campos selecionados.

4.5.3 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir das caracterizações do biomaterial, análises *in vitro* e *in vivo* foram submetidos a análise estatística pelo software GRaphPad Prisma 7.01. Os valores foram tabulados, submetidos ao teste de normalidade sendo que os valores dos testes de viabilidade celular, de conteúdo de proteína total e de *push out* foram avaliados por meio do teste de análise de variância um fator (ANOVA), enquanto os valores dos testes de fosfatase alcalina foram avaliados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todos os testes foi estabelecido o nível de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

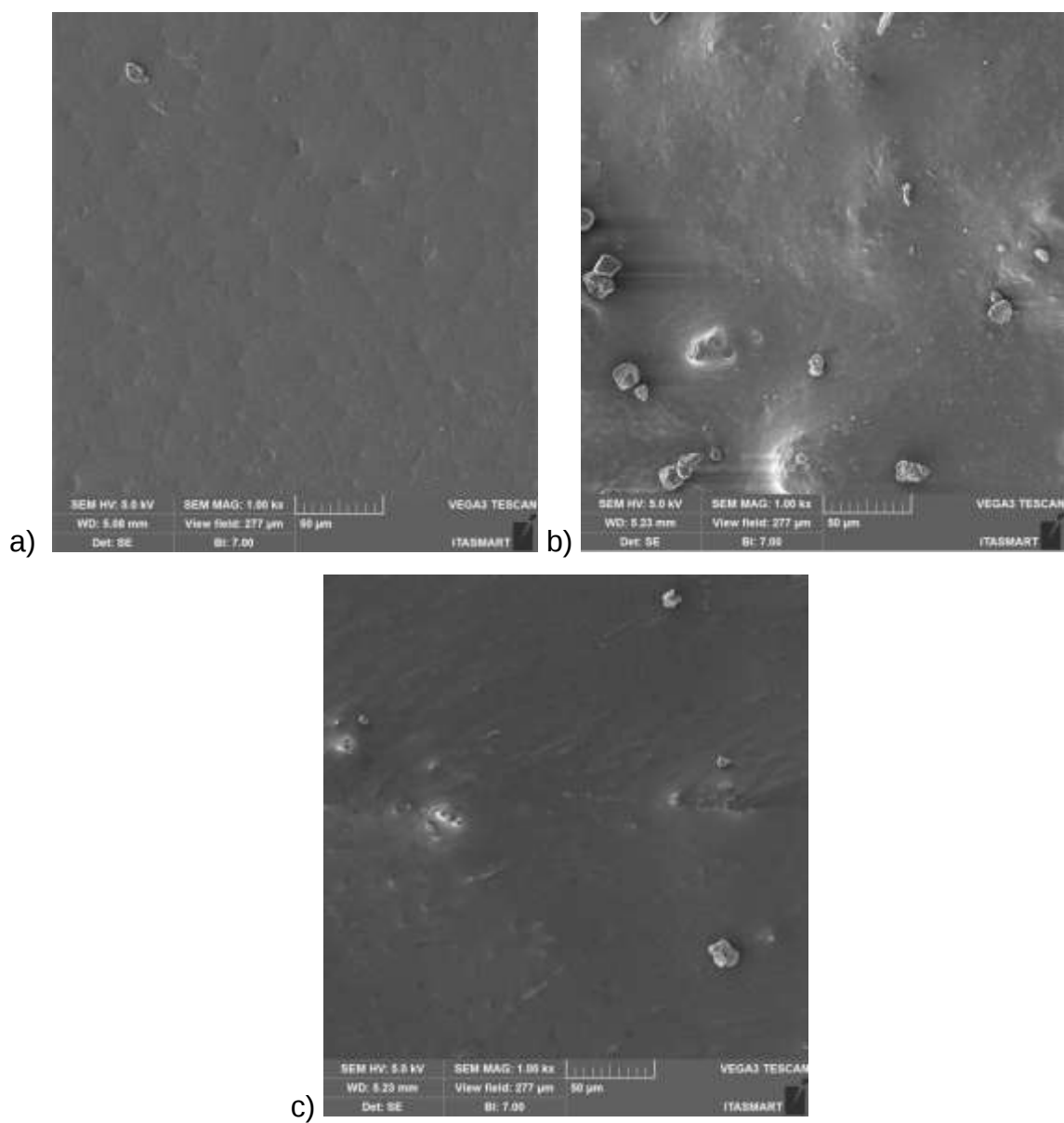
5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras representativas de cada grupo foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura para visualização das características de superfície dos grupos: zircônia polida (Z), zircônia incorporada com biovidro 45S5 (45) e zircônia incorporada com o biovidro biok (bk).

As análises de MEV por elétrons secundários (SE) demonstram que apesar de ambos os grupos recobertos com biovidros apresentarem uma superfície regular, o grupo 45 apresentou-se aparentemente mais rugoso quando comparado ao grupo bk, por outro lado, o grupo z não demonstrou rugosidade significativa (Figura 9). Além disso, ao realizar a análise da subsuperfície do material por elétrons retroespalhados (BSE), pôde-se observar a presença de trincas no grupo 45 e indícios de cristalização no material, que não foram observados no grupo bk (Figura 10).

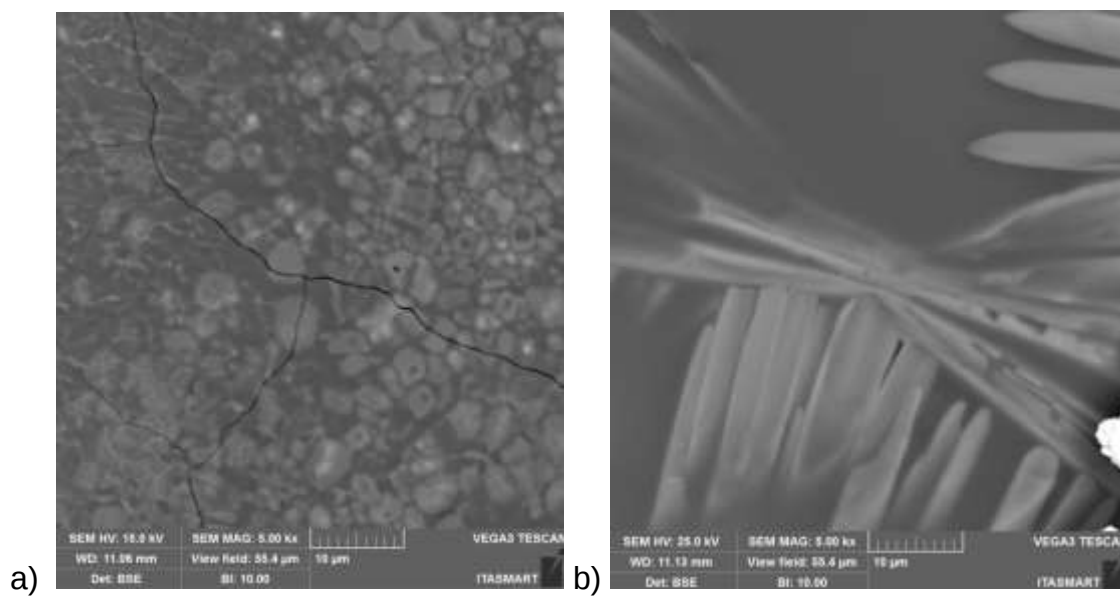
Quando analisados por MEV na presença de meio de cultura, as imagens do grupo 45 sugeriram maior rugosidade e perda de massa, aspectos que podem indicar maior solubilidade quando comparado ao grupo bk (Figura 11).

Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura SE, magnificações de 1.00kx



Legenda: A) Superfície da amostra de zircônia; b) Superfície da amostra recoberta com 45S5; c) Superfície da amostra recoberta com biok.
 Fonte: Elaborado pela autora.

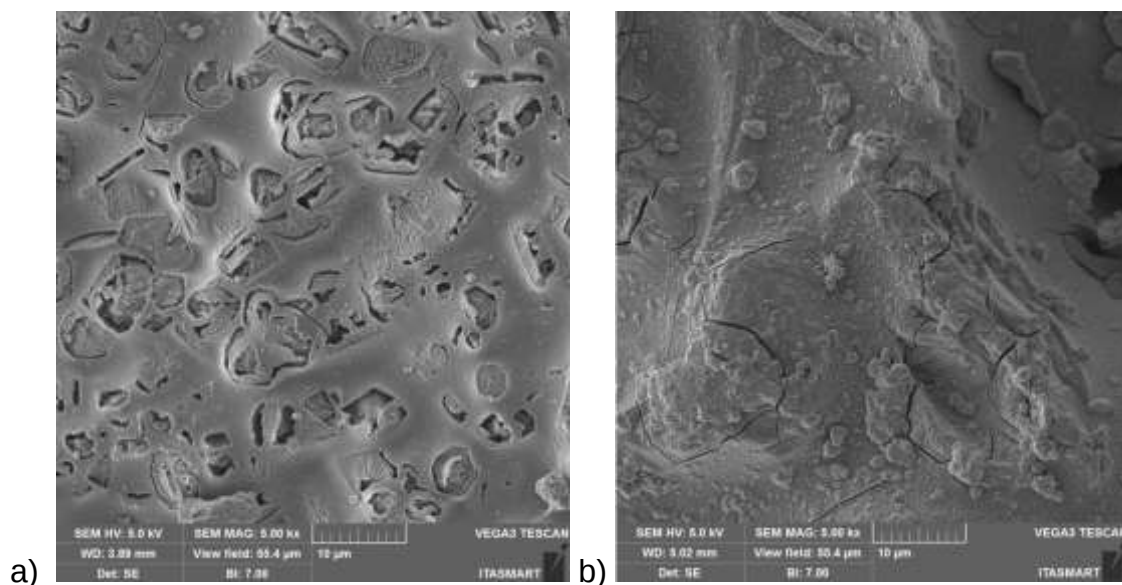
Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura BSE, magnificações de 5.00kx



Legenda: a) amostra do grupo 45S5; b) amostra do grupo biok.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura SE com meio, magnificações de 5.00kv



Legenda: a) amostra do grupo biok; b) amostra do grupo 45S5.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Análise de rugosidade superficial

Na superfície de trabalho de cada uma das cinco amostras foi analisada a rugosidade de superfície, nos parâmetros Ra (rugosidade média absoluta das alturas das irregularidades ao longo do perfil; parâmetro de altura), RSm (espaçamento ou largura média do perfil das irregularidades dentro de um comprimento de amostragem; parâmetro híbrido) e RZ (profundidade da rugosidade média). Os resultados foram avaliados individualmente e obtivemos uma média entre os três valores que nos permitiram observar que as amostras do grupo zircônia apresentam menor rugosidade, seguida pelo grupo biok e grupo 45S5, o qual exibiu a maior rugosidade superficial. Todos os grupos apresentaram diferença estatística utilizando o método de Tukey (95% relevância, $p=0.000$), como demonstrado no quadro 1.

Quadro 1: Rugosidade média obtida das amostras.

Grupos	Ra	Diferença observada
Zircônia	0,214 ± 0,0468	A
Zircônia + Biok	3,502 ± 1,000	B
Zircônia + 45S5	3,940 ± 0,596	C

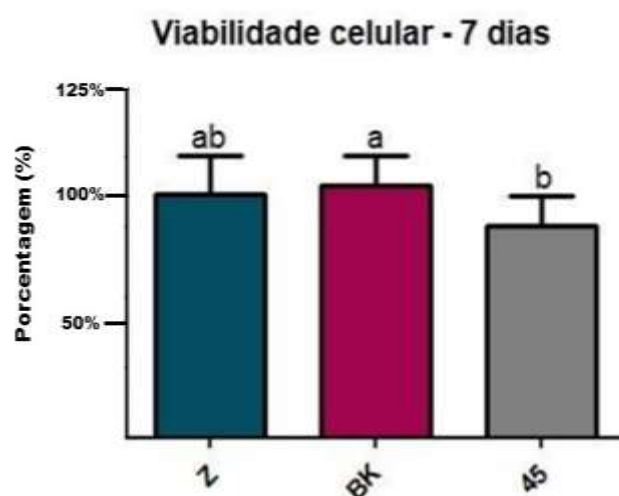
Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Ensaio biológicos *in vitro*

5.3.1 Determinação da viabilidade celular

Os dados de viabilidade celular obtidos possibilitaram identificar que os três grupos experimentais não foram citotóxicos. Foi observado que o grupo 45S5 exibiu a menor viabilidade celular a qual diferiu estatisticamente do grupo biok ($p < 0,05$), porém não diferiu do grupo zircônia ($p > 0,05$). Os grupos zircônia e biok não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico com o valor de média e desvio padrão ($\pm$) de viabilidade celular dos grupos experimentais.

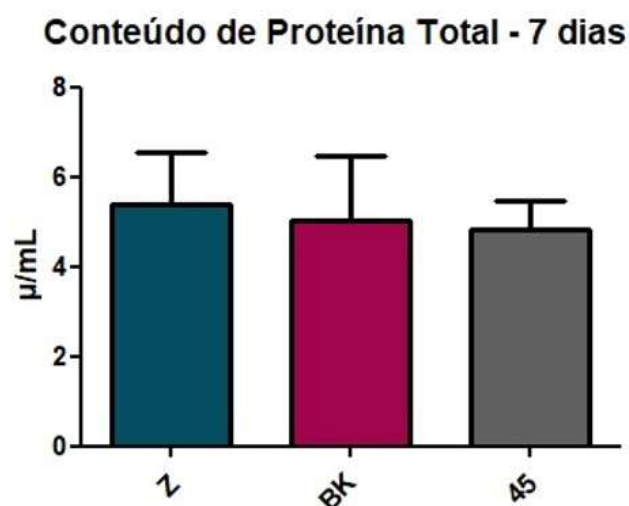


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Conteúdo de proteína total

Os dados obtidos do conteúdo de proteína total dos grupos experimentais foram submetidos à análise estatística por meio do teste de análise de variância um fator (ANOVA). Contudo, não observamos diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), como demonstrado na figura 13.

Figura 13 – Gráfico com valor de média e desvio padrão ($\pm$) do conteúdo de proteína total dos grupos experimentais.

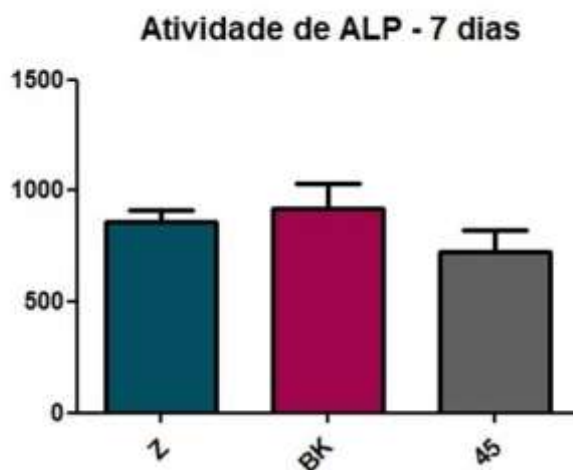


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.3 Atividade de fosfatase alcalina

Os dados da atividade de fosfatase alcalina (ALP) obtidos possibilitaram identificar que os grupos zircônia (z) e 45S5 (45) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$), enquanto que o grupo biok (bk) não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) com os grupos e zircônia (z) e 45S5 (45) conforme demonstrado na figura 14.

Figura 14 – Gráfico com o valor de média e desvio padrão ($\pm$) da atividade de ALP dos grupos experimentais.

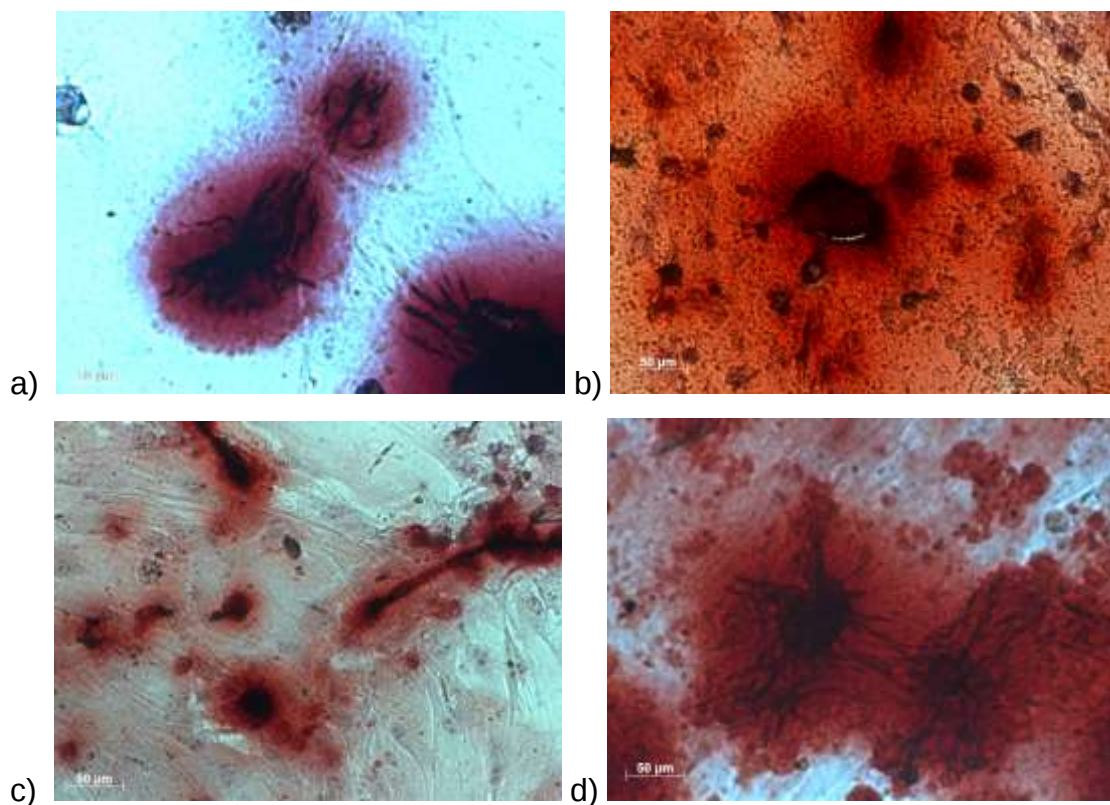


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Formação de nódulos de mineralização

Após o período de 10 dias do cultivo celular foi observada a formação de nódulos de mineralização em todos os grupos experimentais e no poço controle. A figura 15 demonstra os nódulos formados nos diferentes grupos.

Figura 15 – Representação da formação de nódulos de mineralização em aumento de 50µm.



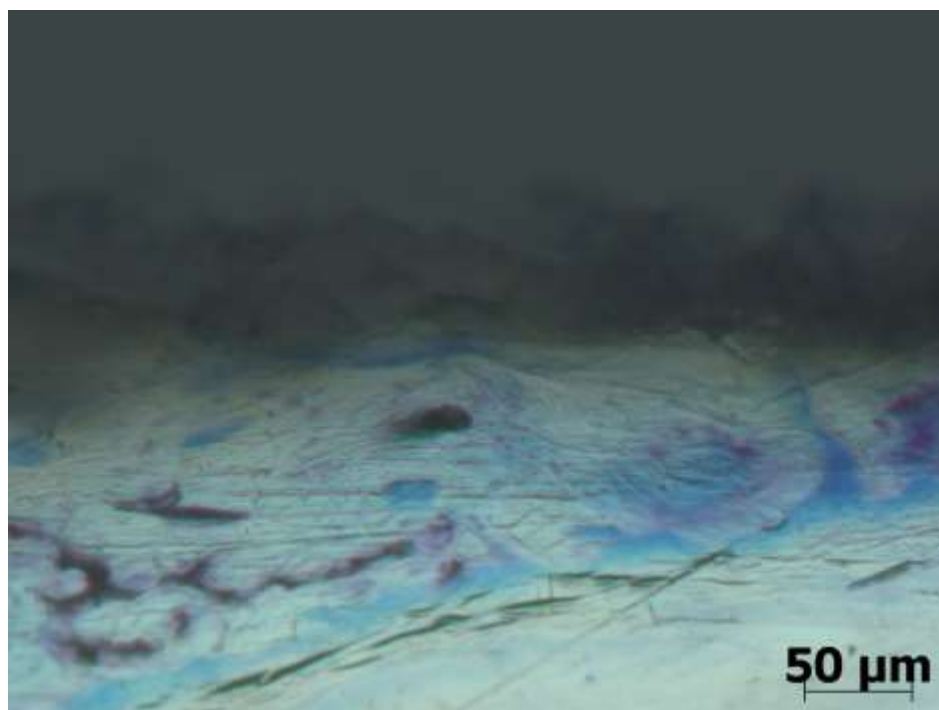
Legenda: a) poço controle; b) grupo 45S5; c) grupo biok; d) grupo zircônia.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Análise histológica

No período pós-operatório determinado de 4 semanas não foi observada nenhuma evidência de inflamação ou infecção nos sítios cirúrgicos, além disso, nenhuma reação adversa ocorreu durante esse processo. Microscopicamente, as peças avaliadas apresentavam secções transversais de osso longo, constituído por osso compacto que formavam as paredes da tíbia, onde foram posicionados os implantes de zircônia (Figuras 16, 17 e 18).

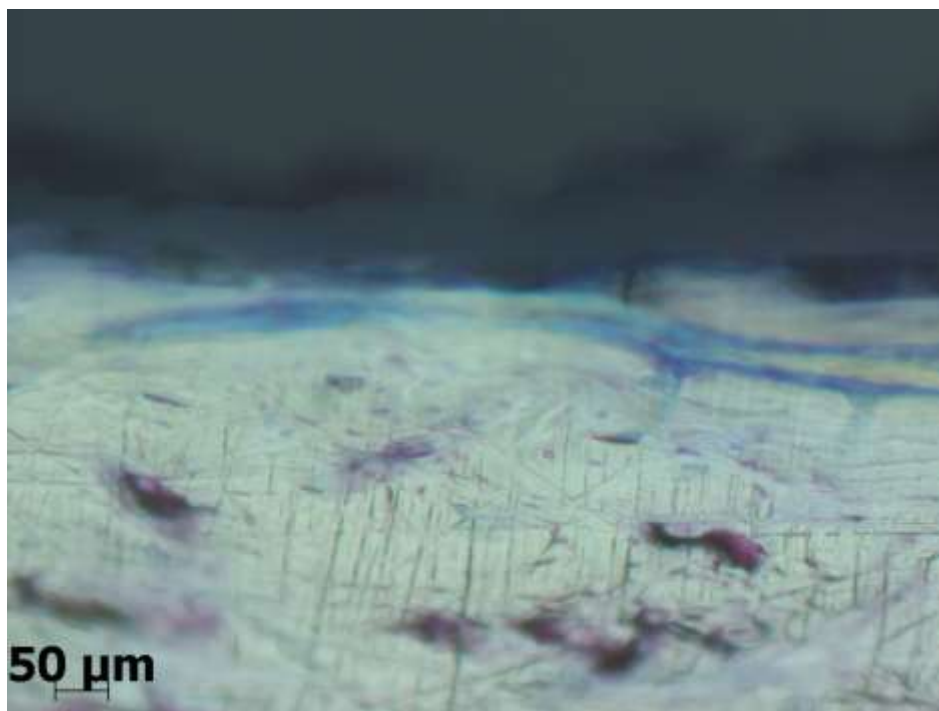
Em todos os grupos podemos observar sinais de neoformação de tecido ósseo com a proliferação de trabéculas ósseas a partir das extremidades das corticais ósseas pré-existentes ao redor dos implantes.

Figura 16 – Interface osso x implante, grupo 45S5



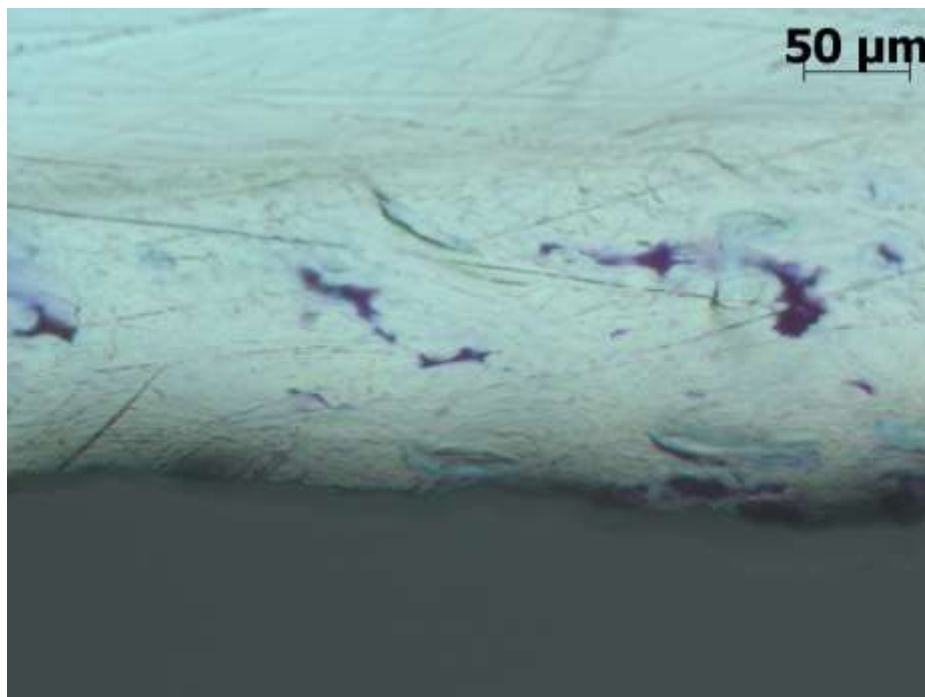
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 – Interface osso x implante, grupo biok



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 18 – Interface osso x implante, grupo zircônia

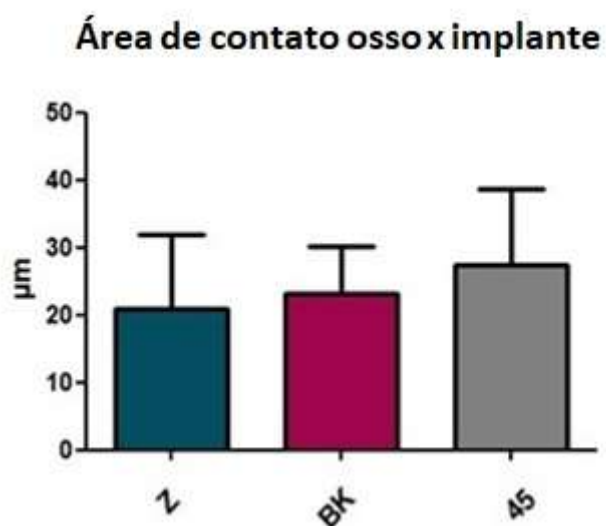


Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Análise histomorfométrica

Foi realizado o teste de variância ANOVA um fator seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey*. Os resultados comparando os valores mensurados da área neoformada entre os grupos analisados estão representados na figura 19. Embora os grupos experimentais apresentem uma maior expressão da área de contato osso x implante, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 19 – Gráfico com os valores da área de contato na interface osso x implante

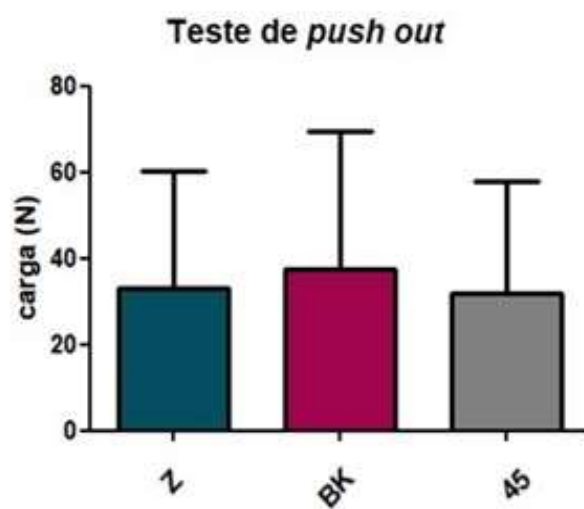


Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Teste *de push out*

Quando comparadas as médias dos três grupos, por meio do teste ANOVA um fator não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre eles, como demonstra o gráfico abaixo.

Figura 20 – Gráfico com os valores médios do teste mecânico de *push out*



Fonte: Elabora pela autora.

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de investigar a capacidade de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e a atividade celular, bem como a osseointegração em tíbias de ratos, os biovidros 45S5 e biok foram incorporados à superfície de amostras de zircônia, caracterizados e testados *in vitro* e *in vivo*, visando novas aplicações em odontologia e ortopedia, esperando-se que esta associação seja capaz de influenciar positivamente as propriedades de osteoindução e osteocondução, além da formação óssea em defeitos críticos.

Apesar do dinamismo e da capacidade de indução e reparação relacionadas ao seu potencial osteogênico, ainda assim, o tecido ósseo tem sua atividade reparadora limitada em locais com defeitos ósseos críticos (Bhattacharjee et al., 2017). Para reduzir esse efeito e influenciar positivamente na regeneração óssea, biomateriais inorgânicos que apresentem adequadas propriedades físicas, químicas e biológicas vêm sendo estudados.

A zircônia é um exemplo de cerâmica muito utilizada (Denry, Kelly, 2008; Ramos et al., 2019; Roy et al., 2019), sendo amplamente aplicada em áreas da odontologia e da ortopedia, por possuir excelente estabilidade química, alta resistência e tenacidade à fratura, além de propriedades estéticas (Ding et al., 2020; Gouveia et al., 2021; Schünemann et al., 2019; Schriwer et al., 2017). Adicionalmente, estudos prévios relataram que a superfície de zircônia apresenta capacidade de promover aumento nos índices de osseointegração e diminuição da adesão de microorganismos patogênicos no material (Depprich et al., 2008; Ding et al., 2020; Kohal et al., 2016; Scarano et al., 2003). Para aprimorar essas propriedades citadas, vem sendo adicionado à superfície de zircônia camadas de vidro bioativo visando melhorar resistência de união e resposta biológica (El-Wassefy et al., 2021; Marin et al., 2018; Radice et al., 2007).

O biovidro 45S5, conhecido como *Bioglass*[®], foi um biomaterial desenvolvido por Larry Hench em 1969, visando promover uma rápida e durável ligação química com o tecido ósseo (Hench, 2006). Contudo, apesar de suas excelentes propriedades biológicas relacionadas à sua alta bioatividade (Jones, 2015) esse vidro possui limitações como a baixa resistência mecânica e tendência à cristalização, fato que o torna inadequado para áreas de suporte de carga, e por

isso, vêm sendo associado a superfícies de implantes, tanto de titânio como de zircônia, com objetivo de acelerar o processo de osseointegração (Costa et al., 2020; Gouveia et al., 2021). Isso ocorre porque em sua composição há íons cálcio, fosfato e óxidos (silício, sódio, potássio, entre outros) que, quando liberados e absorvidos pelas células ósseas, ativam genes relacionados à proliferação celular (Chen et al., 2006; Granito et al., 2011).

Outros biovidros foram desenvolvidos ao longo do tempo, tais como o biok (Belucci et al., 2011; Canillo & Sola, 2009) visando otimizar as propriedades dos vidros. A substituição de Na_2O por K_2O para formular o vidro bioK, derivado do biovidro 45S5, é uma alternativa válida para auxiliar na bioatividade do material, uma vez que foi observado a diminuição do potencial de cristalização nas amostras de biok em comparação com as amostras de 45S5 (Canillo & Sola 2009). Além disso, neste mesmo estudo citado foi observado que, na superfície do espécime houve formação de partículas globulares consideradas cristais de hidroxiapatita recém-formados. Esses resultados estão de acordo com o nosso estudo, uma vez que a partir da análise da topografia superficial por MEV, o bioK apresentou superfície que sugeriu menos rugosidade, exibiu menor presença de trincas e consequentemente menor tendência à cristalização e solubilidade, em comparação com os resultados obtidos da amostra de 45S5, além de ter apresentado a formação de partículas semelhantes à hidroxiapatita. Tais resultados sugerem benefícios ao uso do biok para recobrimentos de superfícies metálicas ou cerâmicas.

A presença de trincas e indícios de cristalização, maior nas amostras de zircônia recoberta com 45S5 quando comparadas com as recobertas pelo biok no presente estudo, pode ser justificada pela necessidade de sinterização do 45S5 em temperaturas mais altas, evento que provavelmente auxiliou no processo de cristalização deixando-o mais suscetível a este processo, como demonstrado no estudo realizado por Belucci & Canillo (2011), que comparou os processos de sinterização dessas duas formulações de vidros.

A atividade e diferenciação de células ósseas *in vitro* é um requisito para uma adequada osteointegração de implantes *in vivo* (Kokubo et al., 2004). No estudo de Kirsten et al. (2015) foram analisadas as propriedades *in vitro* de uma nova formulação de suspensão de vidro em que o Na_2O é substituído por K_2O no biovidro 45S5, dando origem ao PC-XG3, que foi aplicado na superfície de uma amostra de

zircônia, apresentando uma metodologia semelhante à deste trabalho. Esses autores compararam amostras de 45S5 com a nova formulação PC-XG3, e, além de encontrarem formações de hidroxiapatita presente em ambos os grupos, o novo revestimento apresentou resultados motivadores em testes de citotoxicidade e proliferação celular de fibroblastos de camundongos. Esses resultados são semelhantes aos do presente estudo, uma vez que todos os grupos apresentaram valores satisfatórios quanto à citocompatibilidade de acordo com os padrões ISO (10993-5), já que os grupo BK permitiu tanta viabilidade quando a Z, diferindo estatisticamente em relação ao grupo 45 ($p < 0,05$).

Nos testes de expressão de proteína total e fosfatase alcalina, os grupos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Considerando o conceito de que o biovidro 45S5 é o padrão ouro para um material sintético com um comportamento bioativo pronunciado e um material de referência para testes de bioatividade *in vitro*, tanto em aplicações como compósitos, quanto associado com outros materiais (Belucci et al., 2011; Granito et al., 2011; Rizwan et al., 2017). Os resultados são satisfatórios e demonstram que a superfície de zircônia recoberta com bioK possui um alto potencial para cicatrização e remodelação óssea na aplicação de estudos *in vivo*.

Havener et al. (2009) demonstraram que o biovidro 45S5 apresenta melhoria na cicatrização óssea em defeitos metafisários realizados em cães. Seus resultados provaram que esse material bioativo induz o crescimento ósseo recrutando osteoblastos a partir de sinalização iônica, além de criar um ambiente favorável a neoformação óssea e permitir que o osso no local do defeito adquira suas propriedades mecânicas iniciais mais rapidamente. Ademais, demonstraram adequadas propriedades quando associados a matrizes (Gabbai-Armellin, 2018; Lisboa-Filho et al., 2018). No presente estudo, os resultados obtidos por meio das imagens histológicas permitiram visualizar a deposição óssea na área do defeito. Após a análise histomorfométrica, verificou-se maior neoformação óssea nos grupos bioK e 45S5, porém não houve diferença estatística em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Segundo o estudo de Belucci et al. (2011), a substituição de Na_2O por K_2O em biovidros para produção de *scaffolds* visa diminuir sua tendência de cristalização, por ser tratado em temperaturas relativamente mais baixas em comparação com o 45S5, sendo um fator crucial para atividade biológica *in vivo* e

associações a outros biomateriais. A perspectiva deste estudo prévio pode ser observada em nosso trabalho, uma vez que o biok incorporado na superfície da zircônia apresentou características osteocondutoras satisfatórias, demonstrando ser promissor para substitutos ósseos.

A zircônia monolítica é um material com alta estabilidade química e propriedades mecânicas satisfatórias como tenacidade à fratura e alta resistência (Oh et al., 2010; Özkurt et al., 2011; Rekow et al., 2011). As descobertas sobre a influência do vidro bioativo, como o biok, em *scaffolds* de zircônia são escassas. Gouveia et al. (2021) demonstraram que *scaffolds* de zircônia monolítica revestida com vidro bioativo apresentam uma tendência à melhora na resistência mecânica à compressão em comparação a *scaffolds* sem biovidro, contudo, há considerável dificuldade em produzi-los devido a alta porosidade desse biomaterial. Os resultados deste trabalho entram em conformidade com esses dados, uma vez que, apesar de utilizarmos biovidros diferentes dos que foram citados, os implantes de zircônia com adição de vidros bioativos 45S5 e biok na superfície, apresentaram valores semelhantes aos exibidos em implantes de zircônia sem adição do biovidro.

Embora até o momento não haja evidências de estudos que relataram fixação ao tecido ósseo de implantes de zircônia com os biovidros 45S5 e biok, os dados do nosso estudo são satisfatórios, uma vez que, mesmo não havendo um aumento na fixação com os biovidros associados, os implantes de zircônia monolítica apresentam osseointegração satisfatória (Fabris et al., 2021; Gouveia et al., 2017; Vagnkopoulou et al., 2009) e, quando o biovidro é infiltrado em sua superfície, essas características são combinadas com os benefícios de osteointegração bem conhecidos e comprovados nesse trabalho.

Em suma, podemos inferir que os resultados *in vitro* obtidos em nosso estudo reiteram que os biomateriais produzidos não foram citotóxicos, além de terem possibilitado a diferenciação celular e a osteogênese, ressalta-se ainda que o biovidro experimental, biok, apresentou maior viabilidade. Ademais, no estudo *in vivo*, sugere-se a análise em períodos de tempo diversos para verificação da osseointegração em momentos diferentes.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados acima descritos pôde-se concluir que os recobrimentos de implantes de zircônia com os biovidros 45S5 e biok foram produzidos adequadamente. Nas etapas biológicas *in vitro* e *in vivo* observou-se que todas as amostras permitiram a atividade e diferenciação celular, bem como neoformação óssea ao redor dos implantes. Contudo, novos estudos com ênfase na propriedade mecânica e diferentes períodos de análise de neoformação óssea podem fornecer informações adicionais sobre o comportamento do recobrimento dos biovidros na superfície de implantes de zircônia.

REFERÊNCIAS

- Aguilar-Reyes EA, León-Patiño CA, Jacinto-Díaz B, Lefebvre L-P. Structural Characterization and Mechanical Evaluation of Bioactive Glass 45S5 Foams Obtained by a Powder Technology Approach. *J Am Ceram Soc.* 2012;95(12):3776–80. doi:10.1111/j.1551-2916.2012.05465.x.
- Albulescu R, Popa AC, Enciu AM, Albulescu L, Dudau M, Popescu ID, et al. Comprehensive In Vitro Testing of Calcium Phosphate-Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications. *Materials (Basel).* 2019 Nov 10;12(22):3704. doi: 10.3390/ma12223704. PMID: 31717621; PMCID: PMC6888321.
- Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Nov 1;56:538-44. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.026. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26249625.
- Arlucea N, Brizuela-Velasco A, Dieguez-Pereira M, Punset M, Molmeneu M, Sánchez Lasheras F, et al. Zirconia vs. Titanium Dental Implants: Primary Stability In-Vitro Analysis. *Materials (Basel).* 2021 Dec 20;14(24):7886. doi: 10.3390/ma14247886. PMID: 34947480; PMCID: PMC8705369.
- Bacchelli B, Giavaresi G, Franchi M, Martini D, De Pasquale V, Trirè A, et al. Influence of a zirconia sandblasting treated surface on peri-implant bone healing: An experimental study in sheep. *Acta Biomater.* 2009 Jul;5(6):2246-57. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.024. Epub 2009 Jan 31. PMID: 19233751.
- Bautista CRG, Santos IVD, Moraes RM, Chiba FY, Sumida DH, Moraes MB, et al. Sitagliptin's effects on bone tissue and osseointegration in diabetic rats. *Arch Oral Biol.* 2019 Jun;102:238-243. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.04.018. Epub 2019 May 2. PMID: 31082700.
- Bellucci D, Cannillo V, Ciardelli G, Gentile P, Sola A. Potassium based bioactive glass for bone tissue engineering. *Ceramics International.* 2010;36(8):2449-53. doi:10.1016/j.ceramint.2010.07.009
- Bellucci D, Cannillo V, Sola A. A new potassium based bioactive glass: sintering behaviour and possible applications for bioceramic scaffolds. *Ceram Int.* 2011;37(1): 145-57. doi:10.1016/j.ceramint.2010.08.020.
- Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Kim HW, Maiti TK, Bhattacharya D, et al. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomater.* 2017 Nov;63:1-17. doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.027. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28941652.
- Campos TM, Ramos NC, Machado JP, Bottino MA, Souza RO, Melo RM. A new silica-infiltrated Y-TZP obtained by the sol-gel method. *J Dent.* 2016 May;48:55-61. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.004. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27012859.

Cannillo V, Sola A. Potassium-based composition for a bioactive glass. *Ceram Int*. 2009;35(8):3389-93. doi:10.1016/j.ceramint.2009.06.011.

Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, et al. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jan;76(1):151-62. doi: 10.1002/jbm.a.30528. PMID: 16258959.

Charlotte SM, Meng D, Telle R, Boccaccini AR. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes and bioactive glass particles for bioactive composite coatings. *Ceram Int*. 2010;36(1):307–312. doi: 10.1016/j.ceramint.2009.09.008

Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Apr;27(11):2414-25. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16336997.

Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-temperature degradation of zirconia and implications for biomedical implants. *Rev Mater Res*. 2007 Aug; 37: 1. ©32. doi: 10.1146/annurev.matsci.37.052506.084250.

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*. 2020 Nov 1;579:680-698. doi: 10.1016/j.jcis.2020.06.102. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32652323.

Da Cruz Vegian MR, Costa BCA, de Fátima Santana-Melo G, Godoi FHC, Kaminagakura E, Tango RN, et al. Systemic and local effects of radiotherapy: an experimental study on implants placed in rats. *Clin Oral Investig*. 2020 Feb;24(2):785-797. doi: 10.1007/s00784-019-02946-5. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31154539.

Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2004 Dec;25(27):5857-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.043. PMID: 15172498.

De Araújo-Júnior ENS, Bergamo ETP, Campos TMB, Benalcázar Jalkh EB, Lopes ACO, Monteiro KN, et al. Hydrothermal degradation methods affect the properties and phase transformation depth of translucent zirconia. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020 Dec;112:104021. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104021. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32882676.

Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol*. 2006 Jan;77(1):73-80. doi: 10.1902/jop.2006.77.1.73. PMID: 16579706.

Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008 Mar;24(3):299-307. doi: 10.1016/j.dental.2007.05.007. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17659331.

Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Naujoks C, Wiesmann HP, Kiattavorncharoen S, et al. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med*. 2008 Dec 11;4:30. doi: 10.1186/1746-160X-4-30. PMID: 19077228; PMCID: PMC2614983.

Ding Q, Zhang R, Zhang L, Sun Y, Xie Q. Effects of Different Microstructured Surfaces on the Osseointegration of CAD/CAM Zirconia Dental Implants: An Experimental Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020 Nov/Dec;35(6):1113-1121. doi: 10.11607/jomi.8207. PMID: 33270051.

Dos Santos Trento G, Hassumi JS, Buzo Frigério P, Farnezi Bassi AP, Okamoto R, Gabrielli MAC, et al. Gene expression, immunohistochemical and microarchitectural evaluation of bone formation around two implant surfaces placed in bone defects filled or not with bone substitute material. *Int J Implant Dent*. 2020 Dec 1;6(1):80. doi: 10.1186/s40729-020-00279-7. PMID: 33258065; PMCID: PMC7704835.

El-Wassefy NAM, Özcan M, Abo El-Farag SA. Effect of Simultaneous Sintering of Bioglass to a Zirconia Core on Properties and Bond Strength. *Materials (Basel)*. 2021 Nov 23;14(23):7107. doi: 10.3390/ma14237107. PMID: 34885262; PMCID: PMC8658472.

Fang W, Zhao S, He F, Liu L, Yang G. Influence of simvastatin-loaded implants on osseointegration in an ovariectomized animal model. *Biomed Res Int*. 2015;2015:831504. doi: 10.1155/2015/831504. Epub 2015 Mar 29. PMID: 25893198; PMCID: PMC4393925.

Gabbai-Armelin PR, Caliarì HM, Silva DF, Cruz MA, Magri AMP, Fernandes K R, et al. Association of Bioglass/Collagen/Magnesium composites and low level irradiation: effects on bone healing in a model of tibial defect in rats. *Laser Ther*. 2018 Dec 31;27(4):271-282. doi: 10.5978/islsm.27_18-OR-25. PMID: 31182902; PMCID: PMC6513765.

Gautam C, Joyner J, Gautam A, Rao J, Vajtai R. Zirconia based dental ceramics: structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *Dalton Trans*. 2016 Dec 6;45(48):19194-19215. doi: 10.1039/c6dt03484e. PMID: 27892564.

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*. 2021 Feb;114:104164. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104164. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33243695.

Gouveia, P, Schabbach LM, Souza B, Henriques JÁ, Labrincha JA, Silva FS, et al. New perspectives for recycling dental zirconia waste resulting from CAD/CAM manufacturing process. *J Cleaner Prod.* 2017; 152:454-63. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.117.

Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, et al. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011 Apr;97(1):139-47. doi: 10.1002/jbm.b.31795. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21290592.

Guess PC, Schultheis S, Bonfante EA, Coelho PG, Ferencz JL, Silva NR. All-ceramic systems: laboratory and clinical performance. *Dent Clin North Am.* 2011 Apr;55(2):333-52, ix. doi: 10.1016/j.cden.2011.01.005. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21473997.

Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado atual. *Arq Med.* 2006;19 (4):153-62.

Havener MB, Brown LS, Darmoc MM, Owsiany RS, Clineff TD. Improvements in healing with a bioactive bone graft substitute in a canine metaphyseal defect. In 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Feb 2009.

Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81(7):1705-28. doi:10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x

Hench LL, Wilson J. *An Introduction to Bioceramics.* 2 ed. London: World Scientific. 1999.

Hench L, Polak J, Xynos I, Buttery LD. Bioactive materials to control cell cycle. *Mat Res Innovat.* 2000;3;313-23. doi: 10.1007/s100190000055.

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Nov;17(11):967-78. doi: 10.1007/s10856-006-0432-z. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17122907.

Ioannou AL, Kotsakis GA, Kumar T, Hinrichs JE, Romanos G. Evaluation of the bone regeneration potential of bioactive glass in implant site development surgeries: a systematic review of the literature. *Clin Oral Investig.* 2015 Mar;19(2):181-91. doi: 10.1007/s00784-014-1376-1. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25471690.

Jia Z, Zhang J, Jia C, Nie J, Chu K. Preparation and characterization of mechanical properties of carbon nanotube/45S5Bioglass composites for biologic applications. *Materials Science and Engineering A.* 2011;528(3):1553–1557. doi.org/10.1016/j.msea.2010.10.077.

Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2015 Sep;23 Suppl:S53-82. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.019. PMID: 26235346.

Kaizer MR, Gierthmuehlen PC, Dos Santos MB, Cava SS, Zhang Y. Speed sintering translucent zirconia for chairside one-visit dental restorations: Optical, mechanical, and wear characteristics. *Ceram Int*. 2017 Oct 1;43(14):10999-11005. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.05.141. Epub 2017 May 19. PMID: 29097830; PMCID: PMC5662116.

Kirsten A, Hausmann A, Weber M, Fischer J, Fischer H. Bioactive and thermally compatible glass coating on zirconia dental implants. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):297-303. doi: 10.1177/0022034514559250. Epub 2014 Nov 24. PMID: 25421839; PMCID: PMC4438729.

Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:173-202. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jan-Feb;23(1):56. PMID: 18437796.

Kohal RJ, Schwindling FS, Bächle M, Spies BC. Peri-implant bone response to retrieved human zirconia oral implants after a 4-year loading period: A histologic and histomorphometric evaluation of 22 cases. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Nov;104(8):1622-1631. doi: 10.1002/jbm.b.33512. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26332678.

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*. 1990 Jun;24(6):721-34. doi: 10.1002/jbm.820240607. PMID: 2361964.

Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Dominiak M. Osseointegration of zirconia implants with 3 varying surface textures and a titanium implant: A histological and micro-CT study. *Adv Clin Exp Med*. 2018 Sep;27(9):1173-1179. doi: 10.17219/acem/69246. PMID: 29912481.

Linkevicius T, Apse P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 May-Jun;23(3):449-56. PMID: 18700367.

Linkevicius T, Vaitelis J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Sep;26 Suppl 11:139-47. doi: 10.1111/clr.12631. Epub 2015 Jun 13. PMID: 26073346.

Lisboa-Filho PN, Gomes-Ferreira PHS, Batista FRS, Momesso GAC, Faverani LP, Okamoto R. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. *Connect Tissue Res*. 2018 Dec;59(sup1):97-101. doi: 10.1080/03008207.2018.1430143. PMID: 29745810.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.

Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *J Dent*. 2007 Nov;35(11):819-26. doi: 10.1016/j.jdent.2007.07.008. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17825465.

Marin E, Horiguchi S, Zanooco M, Boschetto F, Rondinella A, Zhu W, et al. Bioglass functionalization of laser-patterned bioceramic surfaces and their enhanced bioactivity. *Heliyon*. 2018 Dec 8;4(12):e01016. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01016. PMID: 30560211; PMCID: PMC6288463.

Minkiewicz-Zochniak A, Jarzynka S, Iwańska A, Strom K, Iwańczyk B, Bartel M, et al. Biofilm Formation on Dental Implant Biomaterials by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. *Materials (Basel)*. 2021 Apr 17;14(8):2030. doi: 10.3390/ma14082030. PMID: 33920743; PMCID: PMC8073800.

Oh GJ, Yun KD, Lee KM, Lim HP, Park SW. Sintering behavior and mechanical properties of zirconia compacts fabricated by uniaxial press forming. *J Adv Prosthodont*. 2010 Sep;2(3):81-7. doi: 10.4047/jap.2010.2.3.81. Epub 2010 Sep 30. PMID: 21165274; PMCID: PMC2994699.

Özkurt Z, Kazazoğlu E. Zirconia dental implants: a literature review. *J Oral Implantol*. 2011 Jun;37(3):367-76. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00079. Epub 2010 Jun 14. PMID: 20545529.

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*. 2020 Aug;177(16):3617-3624. doi: 10.1111/bph.15193. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32662519; PMCID: PMC7393194.

Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):1-25. doi: 10.1016/s0142-9612(98)00010-6. PMID: 9916767.

Prado RF, Esteves GC, Santos ELS, Bueno DAG, Cairo CAA, Vasconcellos LGO, et al. In vitro and in vivo biological performance of porous Ti alloys prepared by powder metallurgy. *PLoS One*. 2018 May 17;13(5):e0196169. doi: 10.1371/journal.pone.0196169. PMID: 29771925; PMCID: PMC5957353.

Radice S, Kern P, Bürki G, Michler J, Textor M. Electrophoretic deposition of zirconia-Bioglass composite coatings for biomedical implants. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Aug;82(2):436-44. doi: 10.1002/jbm.a.31162. PMID: 17295244.

Ramos NC, Kaizer MR, Campos TMB, Kim J, Zhang Y, Melo RM. Silica-Based Infiltrations for Enhanced Zirconia-Resin Interface Toughness. *J Dent Res*. 2019 Apr;98(4):423-429. doi: 10.1177/0022034518819477. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30763138; PMCID: PMC6429668.

Rekow ED, Silva NR, Coelho PG, Zhang Y, Guess P, Thompson VP. Performance of dental ceramics: challenges for improvements. *J Dent Res*. 2011 Aug;90(8):937-52. doi: 10.1177/0022034510391795. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21224408; PMCID: PMC3170166.

Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Nov;105(11):3197-3223. doi: 10.1002/jbm.a.36156. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28686004.

Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol*. 2017 Mar;88(3):298-307. doi: 10.1902/jop.2016.160245. Epub 2016 Oct 7. PMID: 27712464.

Roy ME, Noel OF, Whiteside LA. Phase Transformation and Roughening in Artificially Aged and Retrieved Zirconia-Toughened Alumina Femoral Heads. *J Arthroplasty*. 2019 Apr;34(4):772-780. doi: 10.1016/j.arth.2018.12.025. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30642707.

Sailer I, Zembic A, Jung RE, Hämmerle CH, Mattioli A. Single-tooth implant reconstructions: esthetic factors influencing the decision between titanium and zirconia abutments in anterior regions. *Eur J Esthet Dent*. 2007 Autumn;2(3):296-310. PMID: 19655552.

Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol*. 2003;29(1):8-12. doi: 10.1563/1548-1336(2003)029<0008:BRTZCI>2.3.CO;2. PMID: 12614079.

Schriwer C, Skjold A, Gjerdet NR, Øilo M. Monolithic zirconia dental crowns. Internal fit, margin quality, fracture mode and load at fracture. *Dent Mater*. 2017 Sep;33(9):1012-1020. doi: 10.1016/j.dental.2017.06.009. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28662859.

Schünemann FH, Galárraga-Vinueza ME, Magini R, Fredel M, Silva F, Souza JCM, et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 May;98:1294-1305. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.062. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30813009; PMCID: PMC6402584.

Sharifi E, Ebrahimi-Barough S, Panahi M, Azami M, Ai A, Barabadi Z, et al. In vitro evaluation of human endometrial stem cell-derived osteoblast-like cells' behavior on gelatin/collagen/bioglass nanofibers' scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Sep;104(9):2210-9. doi: 10.1002/jbm.a.35748. Epub 2016 May 5. PMID: 27087544.

Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24):4353-64. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00339-9. PMID: 12922148.

Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res*. 2018 Apr;62(2):121-133. doi: 10.1016/j.jpor.2017.07.003. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28827030.

Vasconcellos L.M.R., de Oliveira M.V., de Alencastro Graca M.L., de Vasconcellos L.G.O., Carvalho Y.R., Cairo C.A.A. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Materials Research*. 2008 Oct 11 (3): 275-280.doi.org/10.1590/S1516-14392008000300008.

Yan J, Kaizer MR, Zhang Y. Load-bearing capacity of lithium disilicate and ultra-translucent zirconias. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 Dec;88:170-175. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.08.023. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30173069; PMCID: PMC6179910.

Yin L, Nakanishi Y, Alao AR, Song XF, Abduo J, Zhang Y. A review of engineered zirconia surfaces in biomedical applications. *Procedia CIRP*. 2017;65:284-290. doi: 10.1016/j.procir.2017.04.057. Epub 2017 Jul 21. PMID: 29130030; PMCID: PMC5679078.

Yoshinari M. Future prospects of zirconia for oral implants -A review. *Dent Mater J*. 2020 Jan 31;39(1):37-45. doi: 10.4012/dmj.2019-151. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31666487.

Zembic A, Sailer I, Jung RE, Hämmerle CH. Randomized-controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implants in canine and posterior regions: 3-year results. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Aug;20(8):802-8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01717.x. Epub 2009 May 26. PMID: 19486077.

Zhang Y, Chai H, Lee JJ, Lawn BR. Chipping resistance of graded zirconia ceramics for dental crowns. *J Dent Res*. 2012 Mar;91(3):311-5. doi: 10.1177/0022034511434356. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232142; PMCID: PMC3275336.

Zhang Y, Kelly JR. Dental Ceramics for Restoration and Metal Veneering. *Dent Clin North Am*. 2017 Oct;61(4):797-819. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.005. PMID: 28886769; PMCID: PMC5657342.

Zhang Y, Kim JW. Graded structures for damage resistant and aesthetic all-ceramic restorations. *Dent Mater*. 2009 Jun;25(6):781-90. doi: 10.1016/j.dental.2009.01.002. Epub 2009 Feb 1. PMID: 19187955; PMCID: PMC2729131.

Zhang Y, Lawn BR. Novel Zirconia Materials in Dentistry. *J Dent Res*. 2018 Feb;97(2):140-147. doi: 10.1177/0022034517737483. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29035694; PMCID: PMC5784474.

ANEXO A —Certificado do comitê de ética em pesquisa



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 07/2021,

intitulado:- **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RECOBRIMENTO DO BIOVIDRO ASSOCIADO OU NÃO À PRATA NA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE ZIRCÔNIA: ESTUDO IN VIVO E IN VITRO**, sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradores alunas da Graduação Leonardo Alvares Sobral Silva e Sarah de Oliveira Marco Avelino, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 30/08/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/09/2021 a 31/12/2022
Espécie/inagem/raça	Rato Wistar
Nº de Animais	39 (trinta e nove)
Procedimento	350 g / 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Envio para a CEUA Parcial - 30/06/2022 Final - 31/01/2023

São José dos Campos, 30 de de 2021

Andrea Carvalho de Marco

Profa.Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO
COORDENADORA/CEUA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Al. São Ottoni
CEP: 13261-970 – F: (12) 3947-9829 / 9676
Fax: (12) 3947-9826 e-mail: ceua@unesp.br, andrea.marco@unesp.br