

Relatório final (2) Auxílio à Pesquisa Regular

Título do projeto: A influência da texturização de superfície do Ti-6Al-4V com incorporação de Ca e P produzida pela oxidação por plasma eletrolítico em ossos de baixa densidade: Um estudo *in vitro*, *ex-in vivo* e *in vivo*

Pesquisador Responsável: Leonardo Perez Faverani

Instituição Sede: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – “Júlio de Mesquita Filho”

Equipe de Pesquisa:

Roberta Okamoto (Professora da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), Wirley Gonçalves Assunção (Professor da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), Valentim Adelino Ricardo Barão (Professor da FOP-UNICAMP, Piracicaba, SP), Nilson Cristino da Cruz (Professor da FES-UNESP Sorocaba, SP), Adalberto Luiz Rosa (Professor da FORP-USP, Ribeirão Preto, SP), Jairo Matozinho Cordeiro (Doutorando da FOP-UNICAMP, Piracicaba, SP), Tárík Ocon Braga Polo (Doutorando da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), Gustavo Antonio Correa Momesso (Doutorando da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), William Phillip Pereira da Silva (Mestrando da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), Stefany Barbosa (Estagiária de IC da FOA-UNESP, Araçatuba, SP), João Matheus Fonseca e Silva (Estagiário de IC da FOA-UNESP, Araçatuba, SP) e Jaqueline Suemi Hassumi (Estagiária de IC da FOA-UNESP, Araçatuba, SP).

Número do Processo FAPESP: 2016/20297-6

Período de vigência do projeto: 01/02/2017 a 31/01/2019

Período coberto pelo Relatório Científico em questão: 31/01/2018 a 31/01/2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read "L. Faverani".

Leonardo Perez Faverani

A) Resumo do plano proposto

Os implantes médico-odontológicos constituídos por titânio (Ti) são constantemente modificados, em especial, a sua microestrutura, para a obtenção de melhores propriedades físico-químicas e biológicas do osso periimplantar. Assim, o maior desafio atual é desenvolver uma superfície na topografia dos implantes para melhorar a reparação óssea em áreas críticas, representadas principalmente por ossos de menor densidade. Portanto, este estudo terá como objetivo analisar os parâmetros estruturais, moleculares e reparacionais, por meio de um novo método de texturização por oxidação por plasma eletrolítico (PEO) com incorporação de Ca e P na superfície da liga Ti-6Al-4V em ossos de baixa densidade. A caracterização estrutural será realizada em discos de Ti-6Al-4V, os quais serão polidos em lixas sequenciais e em seguida serão submetidos ao método de PEO com incorporação de Ca e P. Os espécimes controles serão os tratados com duplo ataque ácido, comercialmente disponível. Após o processo de texturização, os discos serão analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difratografia de raio X, perfilometria e energia livre de superfície (*baseline*). Os animais utilizados para os estudos *ex-vivo* e *in vivo* (ratas Wistar, n=10) serão divididas em 3 grupos: OBD Ovx (ratas jovens - 6 meses submetidas à ovariectomia para indução da osteoporose); ODN Sham (ratas jovens - 6 meses com osso de densidade normal, somente induzidas ao mesmo estresse) e, OBD Sen (ratas senis - 18 meses com osso de baixa densidade). O estudo *ex-in vivo* será realizado por meio da cultura de osteoblastos provenientes da calvária de 60 ratas pertencentes aos 3 grupos como elucidado anteriormente (OBD Ovx, OBD Sen e ODN Sham). Assim, serão verificados o conteúdo total de proteína, a atividade da ALP e a área de alizarina. No estudo *in vivo*, os mesmos métodos de texturização realizados nos discos, serão realizados na superfície de implantes de Ti-6Al-4V (2 x 4 mm), para a instalação em ambas as tíbias dos animais, para as seguintes análises: torque reverso, PCR (OPG, RANKL e OC), histológica e histométrica (Extensão linear de contato osso/implante - ELCOI e área de osso neoformado - AON), microtomográfica (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), da dinâmica óssea por fluorocromos (calceína/alizarina) e imunoistoquímica (OPG, RANKL e OC). Todos os dados quantitativos serão submetidos à curva de normalidade para o estabelecimento do melhor teste estatístico (paramétrico ou não paramétrico), considerando-se $p < 0,05$ o nível de significância.

Palavras-chaves: Osteoporose, regeneração óssea, técnicas de cultura de células, implantes dentários.

B) Fases realizadas durante a vigência do auxílio

Como proposto no plano de trabalho e cronograma de atividades, periodicamente uma pesquisa nos bancos de dados bibliográficas foi realizada, como pode ser visualizada no relatório parcial e neste relatório, a introdução foi atualizada com os trechos acrescentados a partir do que foi redigido no projeto desta proposta. Estas atualizações permitiram fundamentações para a discussão dos resultados e a literatura atual.

Um outro ponto a ser esclarecido, da mesma forma como já ressaltado no relatório parcial, inicialmente, na redação do projeto, foi proposta a utilização do titânio comercialmente puro (Ticp). A empresa que forneceu os discos e implantes para instalação em ratos (Emfils Implantes Odontológicos, Itu, SP, Brasil), somente foi capaz de nos fornecer os materiais com liga de Ti-6Al-4V, que não implica em nenhum fator depreciativo para o trabalho. Por este motivo, desde o relatório parcial, promovemos a alteração deste o título deste projeto, resumo e demais fases do trabalho, para a matéria prima de Ti-6Al-4V, ao invés de Ticp.

Todas as análises propostas no projeto deste auxílio regular em pesquisa foram realizadas, dentro do prazo proposto e, os resultados foram bastante consistentes para nos encorajar a dissertar os artigos que serão extraídos deste relatório e enviarmos para os periódicos de alto impacto da área. Nenhum artigo ainda foi enviado em função das análises serem finalizadas no fim de janeiro. Portanto, já estamos dividindo os resultados nos artigos e enviaremos para a publicação ainda no mês de março do corrente ano.

1 – Introdução com atualização bibliográfica

Desde o surgimento da utilização do Titânio (Ti) na confecção dos implantes médico-odontológicos e dos princípios da osseointegração, surgem constantemente publicações na literatura para a investigação deste material. A pesquisa na indústria biomédica vem atuando continuamente na busca da melhoria das propriedades estruturais e biológicas das texturizações de superfícies dos implantes. Com objetivos de aumentar a resistência mecânica, resistência a corrosão e favorecer as respostas biológicas da osteointegração, pela maior área de superfície de contato, atraindo de forma eficaz e mais rapidamente células da linhagem osteoblástica, em especial em regiões de menor densidade de tecido ósseo [1, 2].

Tendo em vista a grande variedade de estudos na área de desenvolvimento de técnicas para realizar modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes dentários, podemos destacar as técnicas de adição e as técnicas de subtração [3-7].

As técnicas de adição possuem um grande destaque ao promover uma superfície do implante com saliências, sendo recobertas por plasma spray de titânio - TPS e de hidroxiapatita - HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio e deposição de íons [8, 9]. As técnicas de subtração por meio da criação de poros e pits na superfície do implante, como o eletropolimento, polimento mecânico, tratamentos com ácidos, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio – TiO_2 ou óxido de alumínio – Al_2O_3 , oxidação e irradiação com laser [8, 10-12].

Há comprovação científica de resultados superiores do reparo ósseo nos implantes de superfície rugosa quando comparado com superfícies usinadas, sendo está bem documentada na literatura [1, 12-14]. O aumento da migração, proliferação celular, melhores retenções do coágulo sanguíneo devido ao aumento da área de contato da superfície do implante influenciam na melhor e mais rápida osteogênese [6, 12, 14].

Algumas ligas de titânio e texturizações são empregadas no mercado médico e odontológico sem apresentar antes da comercialização, no mínimo, estudos *in vitro* ou *in vivo* para a investigação das propriedades do material. Isso porque a literatura tem mostrado que alguns desses métodos alteram a resistência mecânica, o comportamento eletroquímico e as repostas reparacionais do titânio [2, 5, 15-17]. Reunir características favoráveis tanto nos aspectos microestruturais como nos aspectos biológicos reparacionais, vem causando uma preocupação diante desta gama de opções de texturização [18-20].

A incorporação por meio da técnica de texturização por adição de cálcio, fósforo ou hidroxiapatita, elementos que são precipitados na matriz do tecido ósseo, através da anodização e o tratamento biomimético [21, 22], são técnicas as quais tem demonstrado maior afinidade com as células fundamentais de formação de osso [12, 14, 23]. A Oxidação por plasma eletrolítico (PEO) ou também denominado como deposição por fásca anódica, apresenta-se recentemente como um novo método para a texturização superficial dos implantes, ainda na fase de testes *in vitro* [24, 25].

Sendo um fator importante para a osseointegração, a criação de um revestimento como alta força adesiva aos substratos, este processo eletroquímico consiste na oxidação acompanhada por microdescargas na superfície do Ti ou suas ligas imersos em um eletrólito, mostrando uma superioridade mecânica, térmica, além das propriedades corrosivas e tricorrosivas, [25-27]. Sendo assim, a oxidação eletrolítica é uma técnica

promissora com passos simples e com métodos químicos bem controlados para a produção de microporos bioativos na superfície dos implantes. [28-30].

Marques et al. (2015) publicaram dois estudos que avaliaram a PEO para a produção de texturização na superfície do TiCP com a incorporação de cálcio, fósforo, prata e sílica, com diferentes concentrações destes elementos para estabelecer as melhores propriedades estruturais e de biocompatibilidade. As superfícies com as maiores concentrações de Ca e P mostraram a formação de uma estrutura cristalina mais homogênea, além de poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela Microscopia de Força Atômica). Além disso, a PEO com incorporação de Ca/P promoveu propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos e melhor proliferação de células tronco mesenquimais nos testes de cultura de células. Diante destes resultados, os autores encorajam novos estudos para a avaliação deste processo de texturização para possibilitar o seu emprego no mercado dos implantes dentários [29, 30].

O processo de remodelação contínua do tecido ósseo se faz necessário para manter a integridade estrutural e para desempenhar suas funções de suporte e homeostase mineral de forma saudável. Este processo de remodelação ocorre em unidades multicelulares básicas como osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, em um processo dinâmico de reabsorção, formação e mineralização óssea. A qualidade do tecido ósseo é um fator essencial para que ocorra o fenômeno da osseointegração, no qual o complexo implante/tecido ósseo perimplantar será submetido à constantes oscilações térmicas, químicas e mecânicas ao longo da vida em um processo de remodelação acoplada [31, 32].

Quando ocorre algum fator que altere o balanceamento do catabolismo e anabolismo, ocorre uma perda da qualidade do tecido ósseo resultando no desenvolvimento de uma condição patológica, comprometendo a taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis [33, 34].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a osteoporose como “uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura” (OMS, 1993). Esta alteração sistêmica que causa diminuição expressiva da densidade óssea, não está posicionada como uma contraindicação no tratamento reabilitador de acordo com a literatura, porém, reduzem a taxa de sobrevivência dos implantes [33-35]. Esta desordem do metabolismo ósseo é

classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa [36-38].

A necessidade de realização de novos estudos que busquem uma otimização do processo de reparo ósseo contínuo no complexo implante/tecido ósseo periimplantar em indivíduos que tendem a desenvolver uma condição sistêmica desfavorável, como a osteoporose é de suma importância, tendo em vista que a expectativa de vida e o acesso facilitado à tratamentos reabilitadores como implantes dentários estão em crescimento contínuo [39-41].

2. Objetivos

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar um novo método de texturização por PEO com incorporação de Ca e P na superfície do Ti-6Al-4V em ossos de baixa densidade, por meio de avaliação *in vitro*, *ex-in vivo* e *in vivo*, em função de parâmetros topográficos e reparacionais.

3. Materiais e Métodos

Para melhor compreensão dos eventos metodológicos deste relatório, esta seção foi dividida em duas seções, de acordo com as etapas e tipos de análises. Assim, as análises de caracterização topográfica foram determinadas como Estudo *in vitro* (3.1) e o item 3.2 para o estudo animal (*ex-in vivo*, para as análises de cultura de células primárias e *in vivo*, para as análises do reparo ósseo periimplantar das ratas).

3.1. Estudo *in vitro*

Caracterização estrutural “*baseline*”

No período de caracterização estrutural *baseline*, três discos e implantes de cada superfície: sem texturização de superfície (Usinado/Controle), com texturização por duplo ataque ácido (AC) e com texturização de superfície com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização da superfície e a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliação da composição química dos tratamentos.

Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de 1 μm^3) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo permitiu a análise qualitativa rápida

(mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies da liga de Ti, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento [42].

Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico

Os implantes de Ti-6Al-4V fornecidos pela empresa Emfils Implantes Odontológicos (Itu, São Paulo, Brasil), com as dimensões de 2 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento, assim como os discos da mesma liga (Ti-6Al-4V) com as dimensões de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, com superfície usinada foram tratados em um reator, acionado por um sistema elétrico composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação alternada com tensão de saída variável, um transformador, um circuito de retificação, um disjuntor, um amperímetro e um voltímetro. Um osciloscópio foi utilizado para verificar a forma da onda após a retificação. O sistema de processamento é composto pelo porta-eletrodos e a cuba eletrolítica.

Através do sistema elétrico, os eletrodos foram alimentados com tensão DC de até 1000 V e corrente máxima de 1,5 A. Um variador de tensão AC, acoplado na fonte permite o ajuste no valor desejado de tensão. No decorrer do tratamento, a temperatura da solução eletrolítica foi medida com um termômetro portátil. Os parâmetros de oxidação são a densidade de corrente de 50 mA/cm² e tensão 250-400 V. O tempo de oxidação foi de 5 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C.

A solução eletrolítica foi preparada dissolvendo Ca(NO₃)₂.4H₂O, NH₄H₂PO₄ (3,6 x 10⁻⁴ M) em 1L de água destilada, com relação molar sendo 1.67, a fim de promover a incorporação de diferentes íons na superfície especificada, com deposição de cálcio e fósforo durante 10 minutos [29, 30]. (Fig. 1)



Figura 1- Sistema integrado para criação de faíscas elétricas (MAO) através da oxidação por plasma eletrolítico e incorporação pela técnica biomimética de íons cálcio e fosfato (Procedimento realizado na Faculdade de Engenharia – UNESP Sorocaba-SP).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Plasma Tecnológico da Faculdade de Engenharia da UNESP de Sorocaba e analisou a caracterização da superfície dos discos e implantes de Ti-6Al-4V com superfície USINADA, AC e texturizada por PEO (grupo teste). A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a composição química dos tratamentos de superfície. Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de $1 \mu\text{m}^3$) foram

realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies dos implantes, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento.

Energia livre de superfície e ângulo de contato

A análise da energia livre de superfície foi realizada somente nos discos AC e PEO e mensurada de acordo com o protocolo sugerido por [43] e foi obtida com auxílio de um goniômetro (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). Os discos foram lavados com detergente líquido neutro e enxaguados com água deionizada até a completa remoção de qualquer traço de detergente. Foram submetidos a dois banhos ultrassônicos, o primeiro com uma solução de metanol e água destilada (1:1) por 10 minutos e o segundo com água destilada por 10 minutos, e então deixados para secar naturalmente.

Para determinação da energia livre de superfície, foi mensurado o ângulo de contato formado entre a superfície do disco e uma gota séssil de cinco líquidos teste, Diiodometano, Etilenoglicol, Formamida, Glicerol e água destilada e deionizada. Esta mensuração foi realizada em três gotas de cada líquido em ambiente com temperatura de 21 ± 1 °C e umidade controlada (Figura 2).

Cada gota séssil (15 μ L) foi depositada na superfície do disco por meio de um dispensador automático acoplado ao goniômetro. A imagem obtida foi capturada imediatamente pelo aparelho e os ângulos de contato formados pelos líquidos na superfície do substrato foram mensurados automaticamente por meio do *software* Ramé-hart DROPimage Standard (Ramé-hart Instrument co., NJ, EUA). O *software* do equipamento fez os cálculos e forneceu os valores do componente polar e apolar, bem como da energia livre de superfície [43].

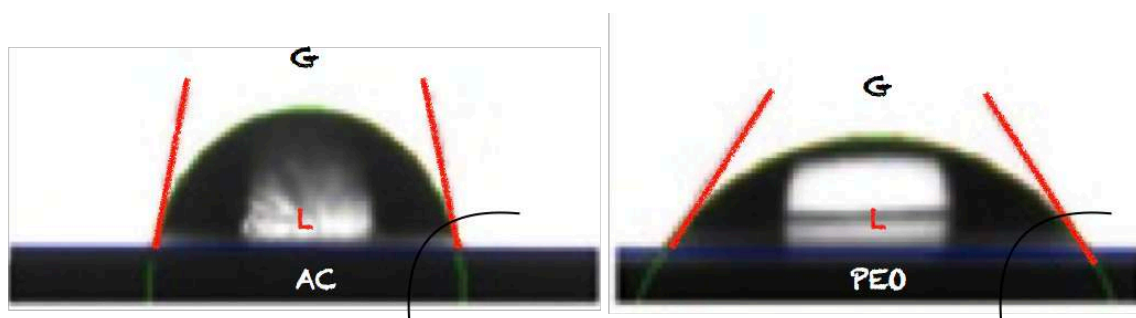


Figura 2 - Imagem ilustrativa demonstrando o ângulo de contato criado entre a água (L) com a superfície (AC / PEO) em relação ao ar (G).

Perfilometria (Rugosidade de superfície)

A análise de rugosidade de superfície (Ra - média aritmética) foi mensurada nos grupos AC e PEO por meio de um perfilômetro com deslocamento (*cut-off*) de 500 µm em tempo constante de 12 segundos. Três mensurações foram obtidas para cada disco de Ti-6Al-4V e a média calculada [44].

3.2. Estudo Animal (*ex-in vivo e in vivo*)

Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOA/UNESP, o qual apresentou aprovação por meio do parecer número 01040-2016 (Como já mostrado no relatório parcial desta pesquisa).

Para a realização do estudo, foram utilizadas 57 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) sendo 38 ratas com 6 meses de idade (Grupos OXV e SHAM) e 19 ratas senis (18 meses de idade: Grupo SENIL), divididas para realização do estudo *ex-in vivo* (n=48) e *in vivo* (n=9), com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos.

Indução de osteoporose

Assim, 38 ratas jovens adultas com 6 meses de idade (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, foram aleatoriamente divididas em dois grupos (n=16 por grupo *in vivo* e 3 por grupo *ex-in vivo*) previamente determinadas (SHAM e OVX), para a indução da osteoporose através da técnica de ovariectomia bilateral, simulando pacientes entre 25 e 30 anos de idade [45, 46] que já apresentam deficiência de estrógeno, hipogonadismo ou até mesmo que fizeram a cirurgia para histerectomia.

As ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral (grupo OVX). Estas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) na

dosagem de 50 mg/kg e Cloridrato de Ketamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dosagem de 5 mg/kg e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, e foi realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e então laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Nesta etapa os ovários foram removidos. O próximo passo caracterizou-se pela sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) nos planos mais profundos e fio Nylon 4-0 (Ethicon™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) no plano superficial (Figura 3). As ratas do grupo saudável (osso de densidade normal: SHAM) passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos chifres uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção. A realização da medicação pós-operatória imediata, de acordo com o comitê de ética, foi aplicada Dipirona Sódica 500 mg/kg de peso, intramuscular, dose única e antibioticoterapia profilática com Pentabiótico 0,1mg/kg do peso do animal, dose única, intramuscular.

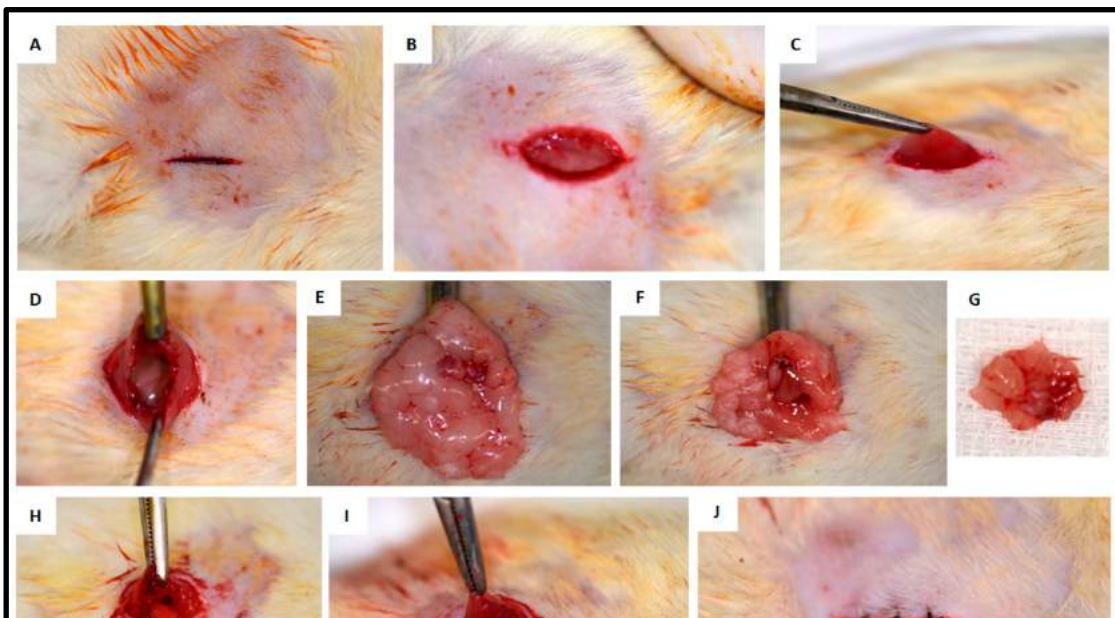


Figura 3 - Imagens demonstrativas do procedimento de ovariectomia: (A) Incisão da pele; (B) acesso ao plano interno; (C) divulsão da camada abdominal; (D) acesso a cavidade abdominal; (E) exposição do chifre uterino e tecido adiposo; (F) Laqueadura do chifre uterino; (G) ovário removido; (H) reintrodução do conteúdo abdominal para o interior da cavidade abdominal; (I) Sutura do plano muscular interno; (J) Sutura do plano externo.

Todos os animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água ad libitum, aguardando por mais 90 dias após ovariectomia, que segundo a FDA americana, é o período que contempla a instalação da osteoporose em ratas.

Passados 90 dias da indução da osteoporose em ratas jovens adultas (SHAM e OVX) e 10 dias após a ambientalização das ratas senis no biotério (SENIL), os animais foram submetidos à eutanásia (*ex in vivo*) e a instalação de implantes (*in vivo*).

Para a confirmação da osteoporose, 6 animais de cada grupo foram sedados e submetidos à decapitação através de “guilhotina” para coleta de sangue, para a dosagem sérica de estógeno (Estradiol – ng/mL), através do método ELISA.

Imunoensaio para dosagem de estógeno

A concentração de estógeno para as ratas dos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL), foi determinada pelo método de ELISA - enzima imunoensaio. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços foram recobertos e incubados com o anticorpo anti-estradiol durante 15-18h a 4°C. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA), em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo a seguir, incubada com os padrões e as amostras de plasma em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotilado à 25°C. A placa foi lavada, o conjugado Streptavidina-HRP foi adicionado e submetido à agitação (300 rpm) à 25°C. A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina). O tampão “*stop*” foi adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante.

3.2.1 Estudo *ex-in vivo*

Passados 90 dias da indução da osteoporose nas 6 ratas jovens adultas (SHAM e OVX) e 10 dias após a ambientalização das ratas senis no biotério (SENIL), foram submetidos à eutanásia através da sobredosagem anestésica com associação de tiopental sódico (150mg por kg de peso) e lidocaína (10mg por ml) pela via intraperitoneal, seguida da antisepsia da pele em região de fêmur do animal, os fêmures foram removidos através de tesouras estéreis e lâminas de bisturi.

Os procedimentos do estudo *ex-in vivo* foram realizados no laboratório de biologia celular da Faculdade de Odontologia, da Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto - SP.

Isolamento e cultura de células

Os fêmures retirados foram transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies) [47-50].

No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea extraída (Figura 4) por irrigação com meio de crescimento (condição não indutora de diferenciação celular) contendo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies).

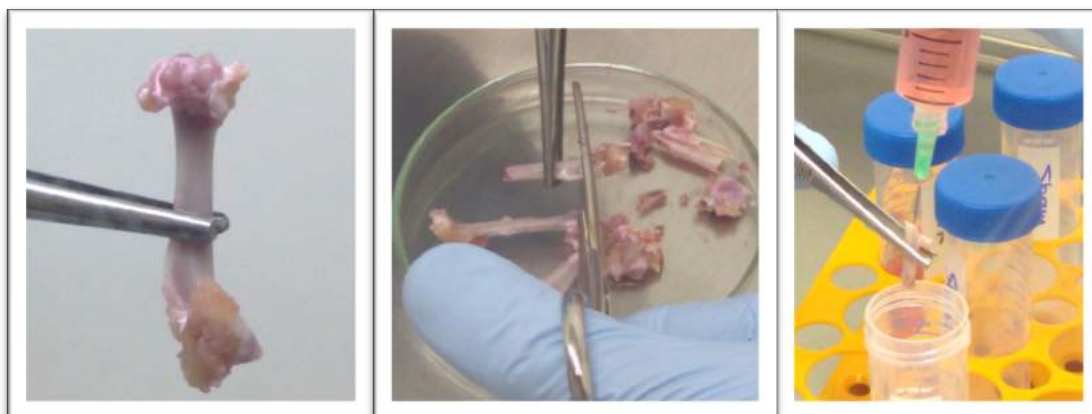


Figura 4 – Imagem passo a passo da extração da medula óssea do fêmur.

As células da medula óssea foram cultivadas em meio de crescimento em garrafas de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) por 7 dias para permitir a seleção das células tronco mesenquimais de medula óssea (CTMs-MO), por aderência ao poliestireno, e a expansão das mesmas. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, sendo realizado as trocas do meio de cultura 3 vezes por semana.

Plaqueamento das células sobre os discos de Titânio

Após a expansão e obtenção do número de CTMs-MO, foi realizado a remoção dos meios de crescimento das garrafas e submetidas ao processo de lavagem com 20 ml de PBS filtrado aquecido, por 3 vezes. As células foram tripnizadas das garrafas por meio da solução de tripsina (9,5ml) com EDTA filtrado (500 µl) e colagenase (500 µl), com a permanência das garrafas na incubadora por 15 minutos, sendo após esse período, realizado a inativação da enzima com 5 ml de MTS 10% (Meio Total Suplementado) e sendo confirmado o desprendimento das células através da visualização por microscópio. As células foram colocadas em tubos para a centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, e após a remoção do sobrenadante, foram ressuspensas, homogenizadas e contadas na câmara de Newbauer (hemocitômetro).

Os discos de titânio esterilizados, foram separados e colocados em placas de poliestireno de 24 poços, sendo organizado na primeira fileira os discos do grupo Controle (superfície usinada), na segunda fileira o Grupo AC (superfície tratada com ataque ácido e jateamento), terceira fileira o Grupo PEO (grupo experimental) e a quarta fileira as células foram colocadas diretamente no plástico, sem a presença de discos de titânio, para o controle diário (Figura 5). As células cultivadas de todos os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) foram plaqueadas em cima dos discos de titânio, com 1,8ml de MTS 10%, juntamente com a concentração de células de acordo com cada análise a serem realizadas.

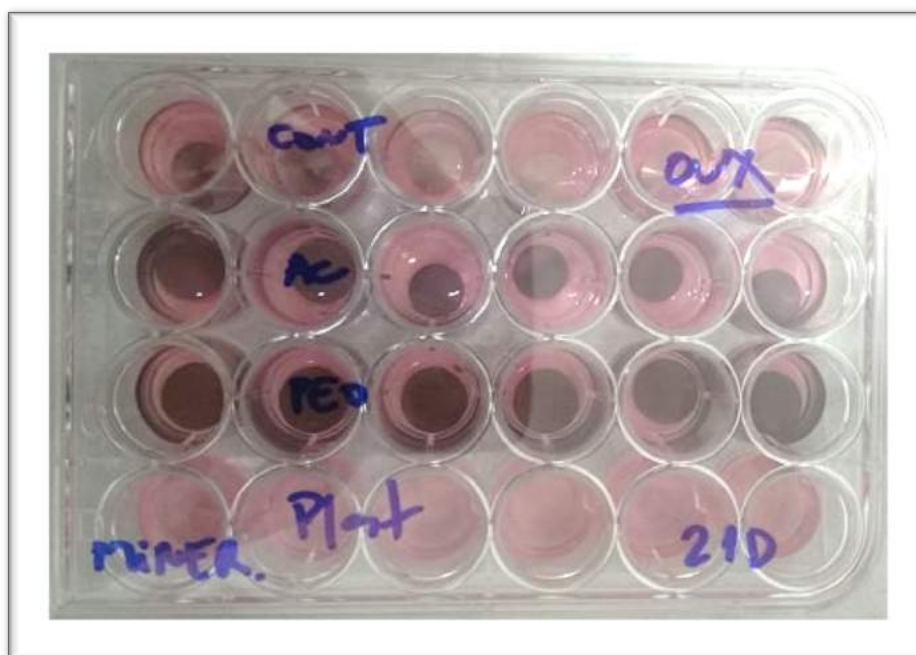


Figura 5 – Imagem representativa do plaqueamento das células nos discos.

Crescimento e Viabilidade Celular

Para a avaliação do crescimento e viabilidade celular, foram plaqueadas uma concentração de 2×10^4 células por disco, sendo utilizados 4 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO), para os períodos de 3, 7 e 10 dias. Durante os períodos testes, as células foram separadas enzimaticamente dos discos por meio da solução de tripsina (9,5ml) com EDTA filtrado (500 μ l) e colagenase (500 μ l). O número total de células e a porcentagem de viáveis e não viáveis foram determinadas através do método da coloração em azul de Trypan (Sigma, St.Louis, MO, USA) (Figura 6) e analisadas, a absorbância foi lida a 570nm no leitor de placas μ Quant (Bio-Tek Instruments Inc.) e os dados foram expressos como absorbância.

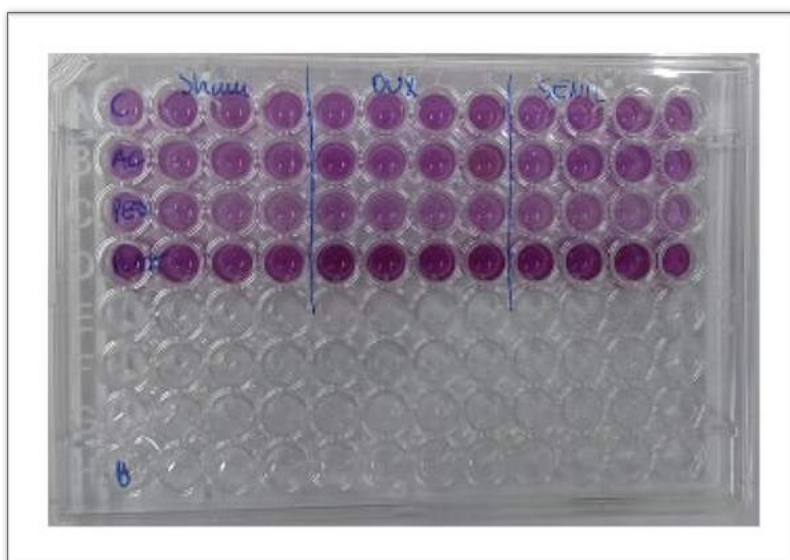


Figura 6 - Imagem representativa após remoção das células dos discos para avaliação.

Análise por PCR em tempo real

Para a análise, foram plaqueadas uma concentração de 2×10^4 células por disco, sendo utilizados 12 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO). No período do 7º dia, a quantificação da expressão gênica dos marcadores ósseos através da: *runt-related transcription fator 2* (RUNX2), fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica; Fator de transcrição 7 ou Osterix (SP7 ou OSX) fator de transcrição essencial para diferenciação terminal de osteoblastos e formação óssea; Fosfatase Alcalina (ALP) enzima para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular; Sialoproteína óssea (BSP)

proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita; Osteocalcina (OC) proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros; e Osteopontina (OPN) proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização [51-54].

Foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total será quantificado a partir de 1 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Esse procedimento será feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III *First Strand Synthesis Systems* (Invitrogen-Life Technologies). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) no aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em duplicata com volume final de 10 µL contendo 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/µL de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) e os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β-Actina e calibrados pelo grupo Controle.

Análise por imunofluorescência

Para a análise por imunofluorescência, realizada no período do 7º dia, foram plaqueadas uma concentração de 2×10^3 células por disco, sendo utilizados 2 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO). As células foram fixadas durante 10 minutos em temperatura ambiente usando paraformaldeído a 4% em 0,1 M de tampão fosfato de sódio (PB), pH 7,2. Para a coloração e imunomarcagem com sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN). Após a lavagem em PB, as culturas foram processadas para imunofluorescência [55, 56]. O processamento, resumidamente, as culturas foram

permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em PB durante 10 minutos, seguido de bloqueio com 5% de leite desnatado em PB durante 30 minutos. Anticorpos primários monoclonais contra BSP (anti-BSP 1: 200, WVID1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), e osteopontina (anti-OPN , 1: 800, MPIIB10-1, Hybridoma Bank, Iowa City, IA) foram utilizados, seguido por Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha) de cabra conjugado com o anticorpo secundário anti-rato (1: 200, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) e Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) conjugado de faloidina (1: 200, Molecular Probes), como um marcador de citoesqueleto. A substituição do anticorpo monoclonal primário com PB foi utilizada como controle. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas num ambiente umidificado durante 60 min à temperatura ambiente. Entre cada passo de incubação, as amostras foram lavadas em PB (3 x 5 min). Antes das observações no microscópio, os espécimes foram lavados em H₂O destilada e os núcleos das células corados com 40,6-diamidino-2-fenil-indole, di-cloridrato (DAPI, Molecular Probes), na proporção 1: 300, durante 5 minutos. Os discos foram colocados com a face para cima em lâminas de vidro e cobertos com lâminulas de vidro com 12 mm de espessura (Fisher científica, Suwanee, GA).

Os espécimes foram examinados em microscópio de epifluorescência através do microscópio óptico Leica DMLB, com objetivas no plano N (x 2.5/0,07, x10/0,25, x20/0,40) e objetivas Fluotar HCX PL (x40/0,75, x100/1,3). As imagens digitais adquiridas foram processadas com o *software* Adobe Photoshop (versão 7.0.1, a Adobe Systems).

Atividade da Fosfatase Alcalina

Para avaliação da proteína total e atividade da fosfatase alcalina no período do 10º dia, foram plaqueadas uma concentração de 2×10^4 células por disco, sendo utilizados 4 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO).

A determinação do conteúdo de proteína total foi realizada por meio da modificação do método de Lowry [57]. As proteínas foram extraídas com 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma) durante 30 minutos e misturados numa proporção de 1: 1 com solução de Lowry (Sigma) durante 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente fenol de Folinand Ciocalteau (Sigma) durante 30 min à temperatura ambiente. A absorbância medida a 680 nm utilizando um espectrofotômetro (Cecil CE3021, Cambridge, Reino Unido). O teor total de proteína foi calculado a partir de uma curva padrão e expressa em mg/ml.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi analisada nos mesmos fragmentos utilizados para a determinação do teor total de proteínas como a liberação de timolftaleína a partir da timolftaleína monofosfatase, usando um kit comercial (labtest Diagnóstica, MG, Brasil). Resumidamente, 50 µl de timolftaleína monofosfato sendo misturada com 0,5 mL de 0,3 M de tampão de dietanolamina, com pH 10,1, durante 2 minutos a 37° C. A solução foi adicionada a 50 µl dos fragmentos obtidos a partir de cada poço durante 10 minutos a 37° C. Para a revelação da cor, foram adicionados 2 ml de 0,09 M de Na₂CO₃ e 0,25M de NaOH. Após 30 min, a absorvância foi medida a 590 nm e a atividade da ALP calculada a partir de uma curva padrão, utilizando timolftaleína para dar uma gama de 0,012-0,4 mmol timolftaleína em h/ml. Os dados foram expressos como a atividade da ALP normalizados para o conteúdo total de proteína [57].

Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos

Para a avaliação da mineralização no período de 21 dias, foram plaqueadas uma concentração de $1,5 \times 10^4$ células por disco, sendo utilizados 5 discos de titânio de cada grupo (Controle, AC e PEO).

No período final, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS aquecido e fixadas com formalina tamponada a 10%, durante 24 h à temperatura de 4°C. Após o período de 24 horas, foi realizada a retirada da formalina e realizado a desidratação numa série graduada de álcoois e coradas com 2% de vermelho de alizarina (Sigma), em pH 4,2, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Assim, os espécimes foram fotografados por câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel câmera, sensor de 6.3 MegapixelCMOS, em uma Canon EF 100 mm F 2.8 / macro). A extração do vermelho de alizarina foi realizada através da colocação de 150 µl de ácido acético a 10% em cada poço, sob agitação suave por 30 minutos. Em seguida, a camada celular foi raspada e a solução foi transferida para *eppendorf* de 1,5ml e agitado em *vortex* por 30 segundos. Foi realizado o aquecimento a 85°C durante 10 minutos para o rompimento dos nódulos, o resfriamento foi realizado em gelo durante 5 minutos e em seguida os tubos foram centrifugados a 20.000g durante 15 minutos. Em uma placa de 96 poços (ELISA), o sobrenadante foi transferido juntamente com a adição de 40 µl de hidróxido de amônia a 10%, sendo por fim realizado a leitura no leitor de placas µQuant (Bio-Tek Instruments Inc.) e os dados foram expressos como absorvância, em um comprimento de onda de 405nm.

Devido a análise através corante de Vermelho de Alizarina para ensaios de mineralização, foram incluídos discos de cada grupo (Controle, AC e PEO) sem células como utilização de controle.

Análise Estatística

Para a realização da análise estatística, todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), com valor de significância de $p < 0.050$, sendo utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA). A análise dos resultados do PCR em tempo real foi realizada através do teste estatístico Kruskal-Wallis um fator. Para avaliação dos resultados obtido através da Viabilidade Celular, foi utilizado o teste ANOVA dois Fatores. Para os resultados obtidos através da Atividade da Fosfatase Alcalina e Nódulos de Mineralização, foi utilizado o teste ANOVA um fator.

3.2.2 Estudo in-vivo

Instalação de implantes

Neste período (90 dias após a ovariectomia (OVX) e cirurgias SHAM e 10 dias após a ambientação das ratas senis no biotério), os animais foram sedados e foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metafise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Assim, foram utilizados implantes de Ti-6Al-4V com superfície texturizada por ataque ácido/jateamento conforme disponibilidade da empresa do Setor – Emfils Implantes Odontológicos (ácidos nítrico, detergente neutro, álcool 95%, secagem, jateamento com óxido de alumínio, álcool 99%, ácido nítrico, detergente neutro, água destilada, álcool 95%, secagem e embalagem), de acordo com os parâmetros da empresa do Setor que forneceram os implantes (grupo AC), ou implantes com superfície texturizada com PEO e incorporadas com CA/P. As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2,0 mm e altura de 6,0 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob

irrigação com solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética LTDA®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany), com travamento e estabilidade inicial (Figura 7).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Portanto, cada animal recebeu os dois implantes que foram testados neste estudo: com texturização controle (AC) ou teste (PEO com incorporação de Ca/P). A escolha das tíbias para a instalação de implantes do grupo controle ou teste foi realizada de forma aleatória, por meio do website: www.randomization.com.

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

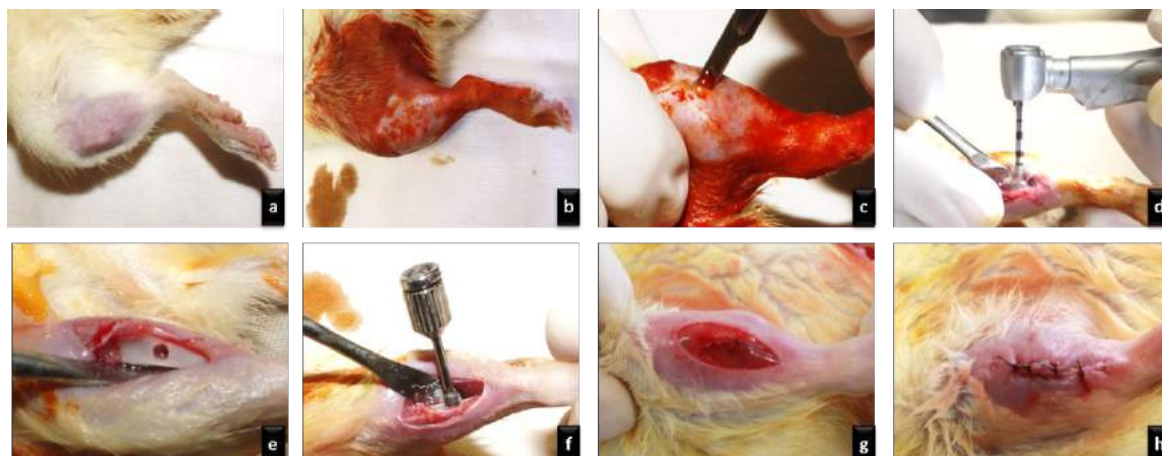


Figura 7- Etapas cirúrgicas do procedimento de instalação de implantes. (A) Tricotomia, (B) antissepsia com PVPI; (C) Acesso cirúrgico à metáfise tibial; (D) e (E) Procedimento cirúrgico de preparação da tíbia para instalação dos implantes e leito ósseo receptor do implante; (F) Instalação do implante com a chave digital; (G) Reposição dos tecidos incisados e sutura por planos; (H) Sutura em pele.

Análises do reparo ósseo periimplantar

Processamento laboratorial para tecidos descalcificados

Análise histológica

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (Tiopental sódico na dosagem de 150 mg/kg associado a lidocaína 2% pela via intraperitoneal) aos 42 dias após a instalação dos implantes, em que foram retiradas as áreas da região da

cirurgia experimental para a realização da análise histológica dos cortes em parafina. Logo após à eutanásia, os animais tiveram as tíbias com os implantes instalados fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (10%) por 8 semanas. Neste momento, os implantes foram removidos por movimento anti-horário com chave digital hexagonal 1,2 mm. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois de 70 a 100%. Após estas etapas, a diafanização foi realizada com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montados em lâminas histológicas. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e as ímpares para as reações de imunistoquímica.

Imunistoquímica

Após a descalcificação dos tecidos periimplantares e confecção das lâminas histológicas que estavam incluídas em parafina, para as reações de imunistoquímica, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários policlonais, produzidos em cabra, utilizados foram contra fosfatase resistente ao tartarato (TRAP; SC 30832; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteoprotegerina (OPG; SC 21038; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL; SC 7627; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), osteocalcina (OC; SC 18319; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX - U.S.A.), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (OC).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotinizado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a avidina e biotina (PK 6100; kit elite, Vector Laboratories) e a diaminobenzidina (Dako, Denmark, SC – U.S.A.) como cromógeno. Após essa etapa, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representarão: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo consideradas positivas as

marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos [58, 59].

Processamento laboratorial para tecidos calcificados

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (Tiopental sódico na dosagem de 150 mg/kg associado a lidocaína 2% pela via intraperitoneal) aos 60 dias após a instalação dos implantes.

Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional estrutural do tecido ósseo, os outros 16 animais pertencentes aos grupos SHAM, OVX e SENIL, tiveram as peças (tíbias) removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70%, em que primeiramente foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.05 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No *software Data Viewer* (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do 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 circular ao redor de todo o implante (ROI) delimitada por 0,25 mm em torno de todo o implante. Esta área ficará definida como Área Total (0,25mm de margem ao redor dos implantes- ROI 2,38mm x 2,38mm) (Figura 8). O *software CTAn* analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershould). Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do implante (Figura 9), o *threshold* utilizado na análise foi de 45-255 tons de cinza, que possibilitará a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes.

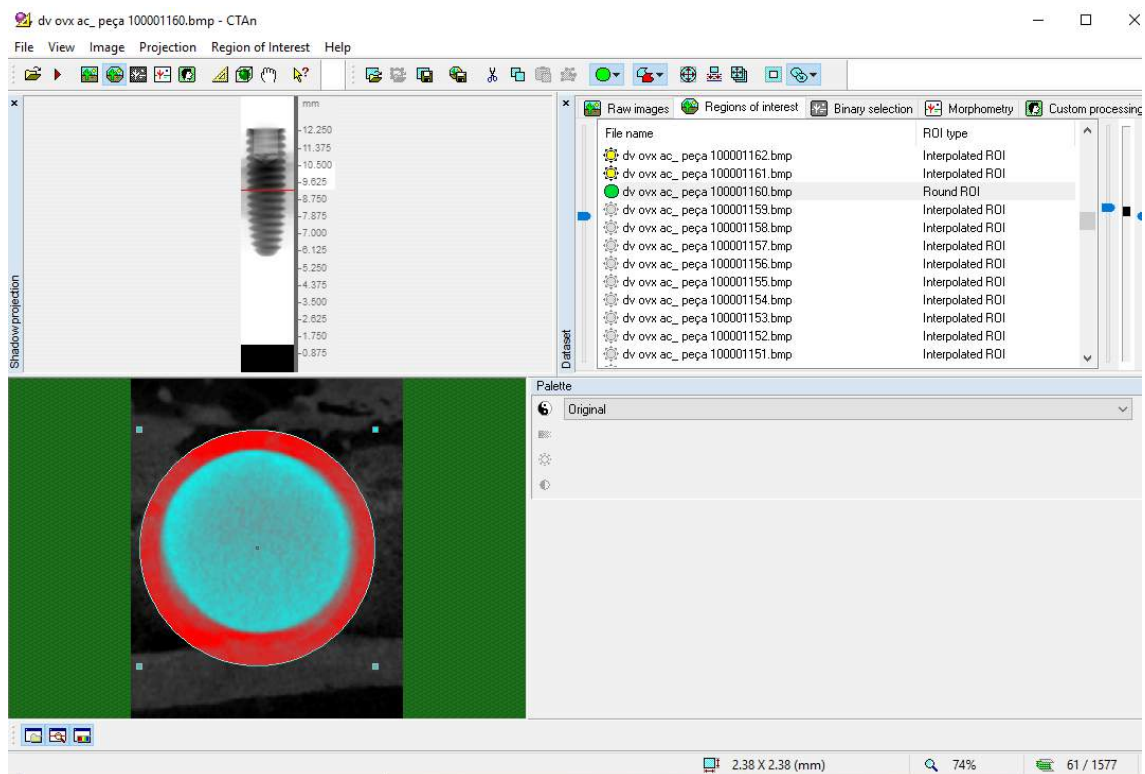


Figura 8 - Demarcação da ROI no software CTAnalyzer. O quadro vermelho mostra uma aproximação para melhor visualização da área ao redor do implante correspondendo a região óssea mais crítica (medular).

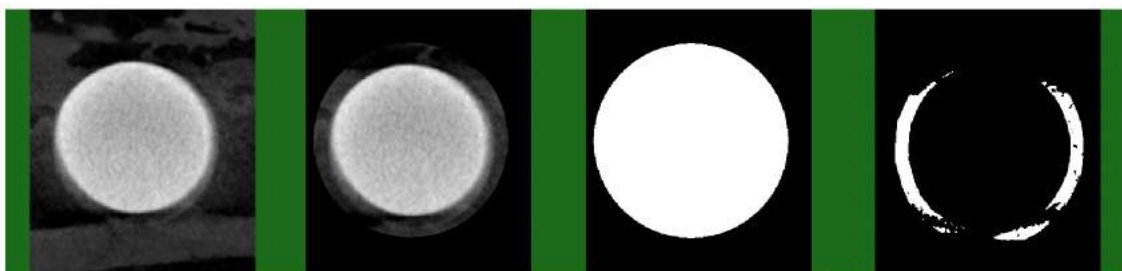


Figura 9 – Seleção da área de interesse (ROI).

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

Teste biomecânico dos implantes (contra-torque)

Para a análise biomecânica, após a realização das microtomografias, metade das tíbias foram estabilizadas em morsa de mesa e com uma chave digital hexagonal de 1,2mm adaptado ao hexágono do implante, o torquímetro digital foi acoplado.

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

Análise molecular do reparo periimplantar (PCR em tempo real)

Imediatamente após a remoção dos implantes referentes as peças da análise biomecânica, as tíbias foram removidas e reduzidas com disco de aço montado em baixa rotação, respeitando pelo menos 0,5 cm em cada face do espaço periimplantar, preservando este osso que estava em contato com as espiras dos implantes. Os animais, após a coleta dos fragmentos ósseos foram submetidos à eutanásia, por meio de sobredosagem anestésica.

A reação de cadeia de polimerase em tempo real (PCR) foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão gênica de marcadores relacionados ao processo de reparo ósseo ao redor dos implantes instalados na tíbia dos animais. Foram utilizadas placas de PCR, previamente desenhadas pelo fabricante e que permitem a expressão de genes relacionados ao processo de reparo tecidual, presentes nas respostas exsudativas, proliferativas e reparadoras até a etapa de mineralização da matriz extracelular do tecido ósseo (OPG, RANKL e OC) (Applied Biosystems).

Cada fragmento ósseo, representado pelo osso periimplantar em reparação foi cuidadosamente lavado em PBS e posteriormente congelado em nitrogênio líquido para que o RNA total seja extraído com o reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a análise da integridade, pureza e concentração do RNA, foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA através da reação de transcriptase reversa (M-MLV transcriptase reversa: Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os cDNAs das amostras foram pipetados juntamente com o Taqman Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems) na placa de PCR Array para detecção de genes envolvido no processo de reparo ósseo (Taqman Array Fast 96 well plate, Applied Biosystems). O PCR em tempo real foi realizado num sistema de detecção para PCR em tempo real Step One

Plus (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pela curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à expressão das proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos ósseos dos alvéolos em reparação dos diferentes períodos experimentais (método $\Delta\Delta CT$). O ensaio foi realizado em quadruplicata.

Microscopia Confocal a laser (dinâmica do osso periimplantar)

Após a realização das microtomografias, a outra metade das peças retornou para o término do processamento laboratorial dos tecidos calcificados, passando pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até a utilização apenas da resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e em seguida, realizado o protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80 μm de espessura.

A partir da obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópico confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens obtidas a partir de diferentes secções das tíbias na região ao redor dos implantes, foram comprimidas a fim de obter o melhor ajuste. Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitiu obter o melhor ajuste de imagens que representará a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens iniciam desde o início da fluorescência, o que representa na nossa metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens possuem a dimensão de 1x1 mm² e correspondentes a secções óticas de 512 por 512 *pixels*. Secções de 2 μm foram escaneadas por 2,5min. Assim, 28

cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação do “*double dichroic*” 488/568 nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representam os filtros que permitiram visualizar os fluorocromos. Eles são localizados no microscópio e quando a luz da lâmpada de mercúrio passa por essas barreiras e alcança os cortes dos espécimes, é possível visualizar as cores dos fluorocromos. Um dos filtros possibilitam a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstituídas através de *software* para a manipulação do microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. O período de aplicação dos fluorocromos foram aos 14 dias, sendo aplicado a calceína (verde) representando o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina, no período de 42 dias, marcando em fluorocromos vermelhos, representando o osso novo. A dinâmica do tecido ósseo é representada pelo *turnover* ósseo, que é observado através da renovação óssea representada pelos fluorocromos vermelhos. Quanto maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo, enquanto que a fluorescência verde representa o osso velho. Essa dinâmica permite observar as duas situações no mesmo corte, portando, observar o que é novo do que é velho.

O osso da tíbia (região periimplantar) apresentam duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa uma precipitação de cálcio de acordo com cada um dos períodos (14 e 42 dias), assim mostrando a conversão de osso velho para osso novo (Figura 10). Essas imagens foram salvas no formato TIFF a e analisadas no *software ImageJ* (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), usando a ferramenta “*color threshold*”, cada imagem foi padronizada de acordo com a tonalidade, saturação e brilho. Primeiro, a calceína foi destacada, e a ferramenta “*measure*” foi utilizada para prover a área em µm². O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. O *turnover* ósseo, nessa abordagem metodológica, foi representado pela diferença entre osso velho (verde) e osso novo (vermelho). Além disso, foi calculado a taxa de aposição mineral (*Mineral apposition rate* - MAR) a partir das imagens sobrepostas (vermelho/verde), por meio da ferramenta “*straight*” também do *software Image J*, mensurando a distância em µm entre

o início da precipitação da calceína até o outro extremo da precipitação do vermelho de alizarina.

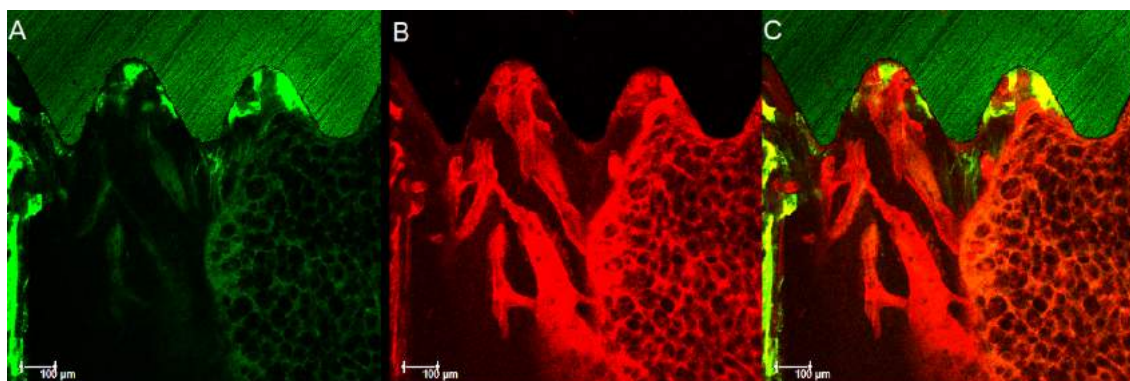


Figura 10 - *Imagens fluorescentes obtidas por microscopia confocal a laser mostrando a precipitação de calceína - cor verde (A), vermelho de alizarina - cor vermelha (B) e a sobreposição de ambos os fluorocromos - calceína/alizarina (C), para a quantificação dos fluorocromos aos 14 e 42 dias após a instalação dos implantes.*

Histometria

As mesmas peças que foram montadas nas lâminas histológicas dos tecidos calcificados dos grupos pertencentes ao estudo de reparo ósseo ao redor dos implantes em tíbias, após a análise em microscopia confocal foram lavadas em água deionizada e coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Histometricamente, foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) bilateralmente e da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante. Como cada implante presente na lâmina foi uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas nos dois lados do implante, de forma que sua média será considerada como valor representativo da unidade. Assim, após a fotomicrografia das lâminas histológicas e salvas em arquivo TIFF, essas foram analisadas no *software Image J* (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), que por meio da ferramenta “*straight*”, calculando o perímetro de osso formado na interface osso/implante (ELCOI) em *pixels*². E para o cálculo de AON, a ferramenta “*free hands*” foi utilizada para mensurar a área de osso neoformado na região correspondente à espira mais central do implante em *pixels* (Figura 11) [60].

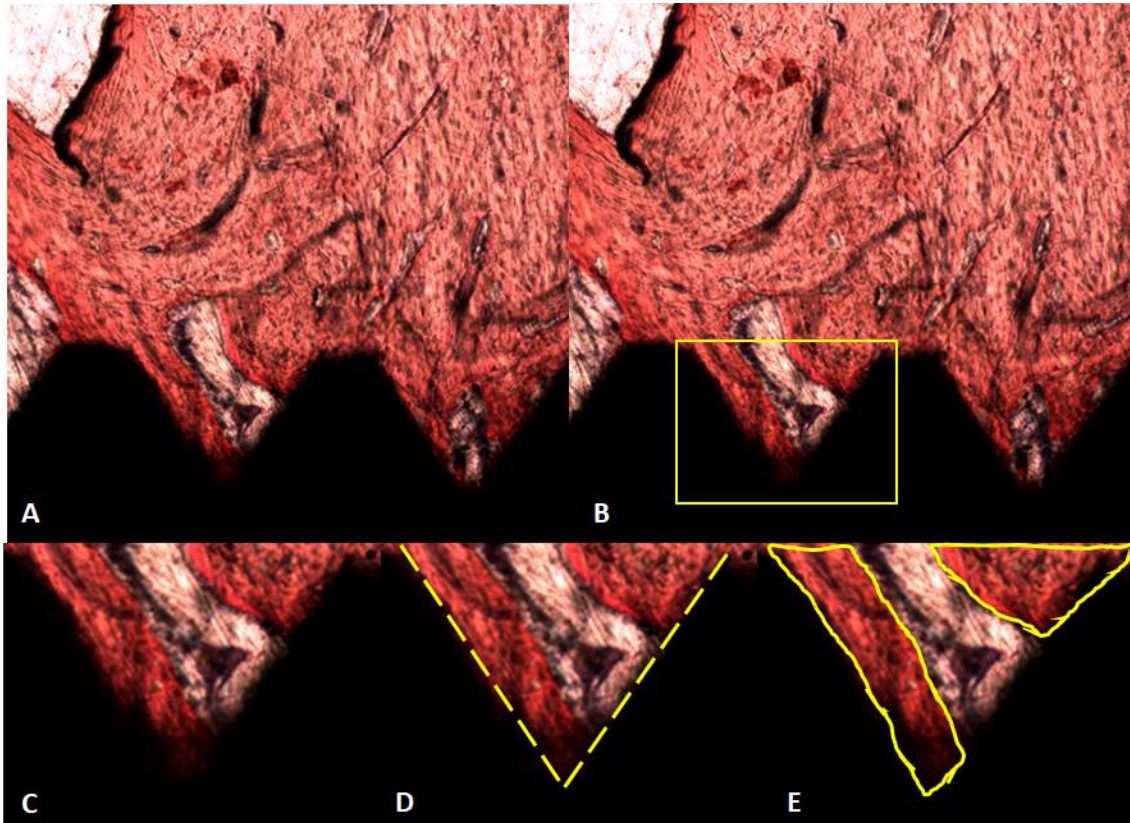


Figura 11 – Imagem representativa de lâminas coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para análises histométricas: ELCOI e AON. (A) figura que representa o corte de tecidos calcificados da área de interesse a ser utilizado. (B e C) região periimplantar – área de interesse para análise (área negativa: implante; e osso em contato com o implante) mais central. (D) região de interesse (triângulo formado na interface do osso com o implante, da região correspondente a espira mais central, selecionada através do programa Image J e através da ferramenta de desenho livre “free hands”. (E) mensuração da área de osso neoformado, regiões coradas pelo vermelho de alizarina.

Análise Estatística

Para a realização da análise estatística nos parâmetros proteicos da imunohistoquímica (OPG, RANKL, OC e TRAP), foi aplicado teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn para as comparações que mostraram diferenças significantes.

Para os dados obtidos pela microtomografia, BV.TV., Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po.(tot), foi realizado a análise estatística pelo T- test, sendo realizado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e Equal Variance Test. E para a análise do torque-reverso foi utilizado o teste Mann-Whitney.

Para a análise molecular por PCR (OPG, RANKL e OC), o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado na interação para os animais jovens (SHAM e OVX), enquanto que para as ratas Senis foi aplicado o teste ANOVA 1 fator. Para as diferenças estatísticas, o pós-teste Tukey foi aplicado em seguida.

A análise do dinamismo ósseo periimplantar pela marcação de Calceína e Alizarina, foram utilizados os testes ANOVA um fator, Kurskal-Wallis um fator, e não comparação dos fluorocromos (Calceína e alizarina) foi utilizado o teste ANOVA dois fatores.

Os resultados obtidos pela histometria (ELCOI e AON), foram analisados pelos testes ANOVA um fator, Shapiro-Wilk e Equal Variance Test.

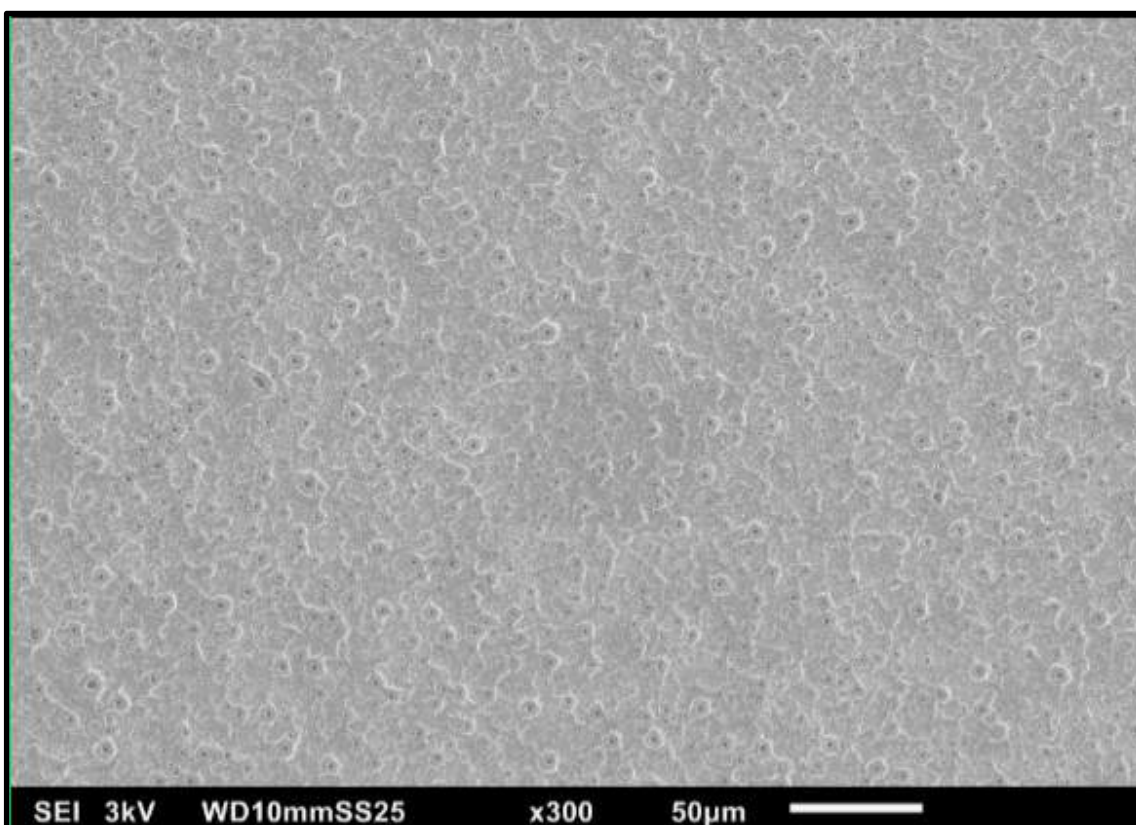
Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), com valor de significância de $p < 0.050$, sendo utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.3 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

4. Resultados

4.1 Estudo *in vitro*

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Independente da magnitude do aumento avaliado na MEV (300 ou 2000x), a representação das fotomicrografias mostrou para o grupo teste (PEO), a obtenção de superfície porosa, como poros visualmente homogêneos, com a geometria semelhante a "vulcão" (Figuras 12 e 13).



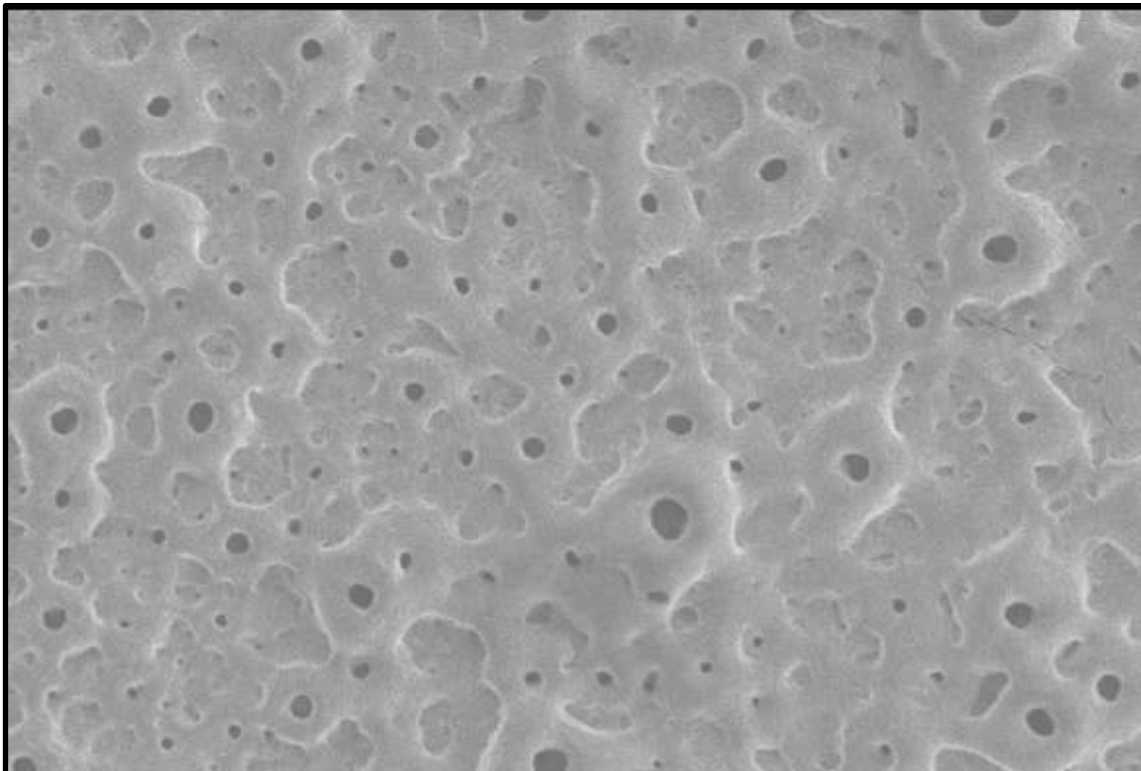


Figura 12 - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na magnitude de 300x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.
F magnitude de 2.000x da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO.

O mapeamento da composição química elementar desta superfície (PEO) pela técnica de EDS confirmou as proporções de Ti, Al e V na composição dos espécimes, inclusive com a incorporação de Ca e P, como ilustrado nas figuras 14 e 15, por meio das porcentagens de massas dos constituintes da liga.

Chemical formula	mass%	Atom%	Sigma	Net	K ratio	Line
C*	1.72	3.97	0.01	3970	0.0003888	K
O	32.40	56.08	0.09	84176	0.0242463	K
Al*	1.18	1.21	0.08	1961	0.0005727	K
P	9.88	8.83	0.24	4706	0.0016382	K
Ca	nd	nd				
Ti*	3.38	1.95	0.76	1182	0.0018734	L
V*	51.45	27.97	0.99	24845	0.0299016	L
Total	100.00	100.00				

Figura 14- Dados representativos da Espectroscopia de Energia Dispersiva da superfície da liga Ti-6Al-4V texturizada por PEO.

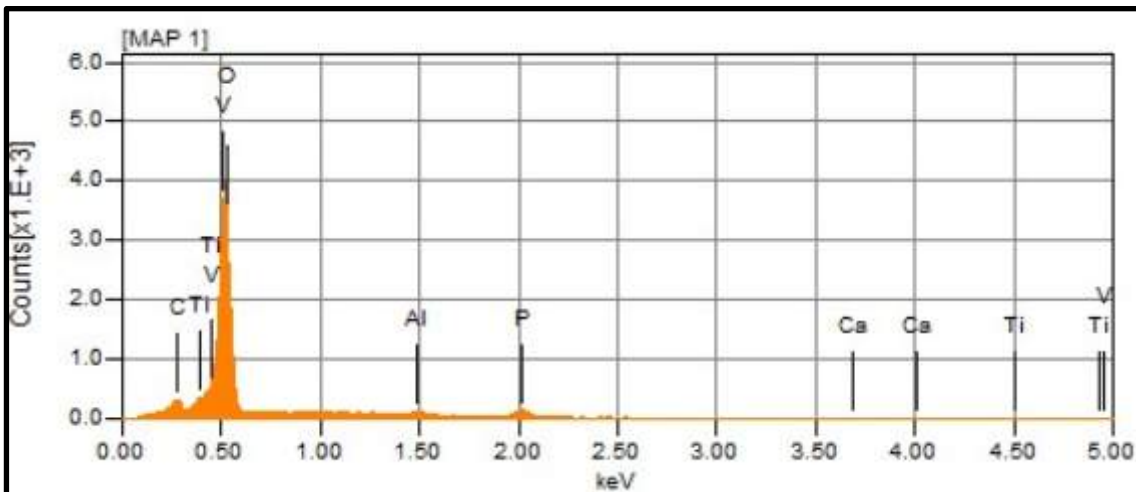


Figura 15 - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da PEO pela técnica de EDS.

O mapa de cores da distribuição dos metais nos espécimes mostrou distribuição homogênea dos constituintes dos espécimes, uma vez que não foi observada qualquer concentração dos metais ou íons em toda a área analisada dos espécimes (Figuras 16 e 17).

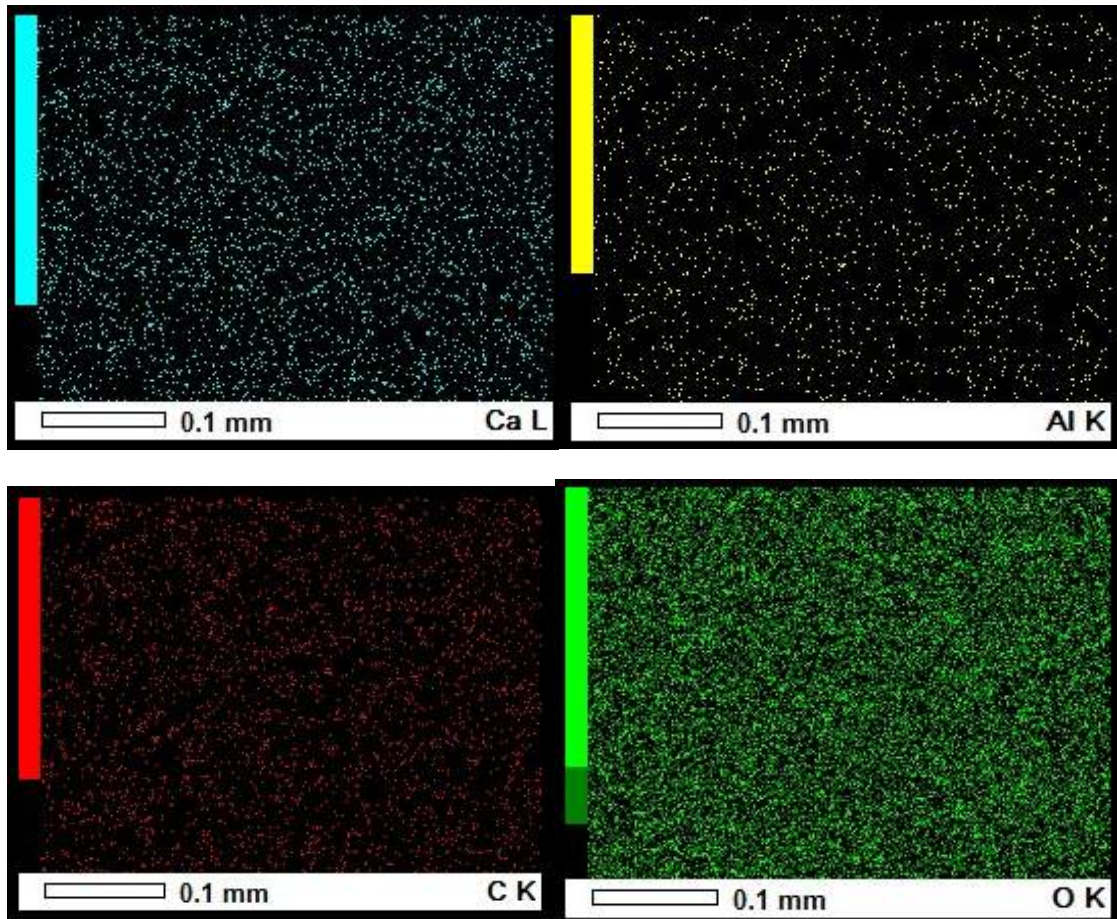


Figura 16 -Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.

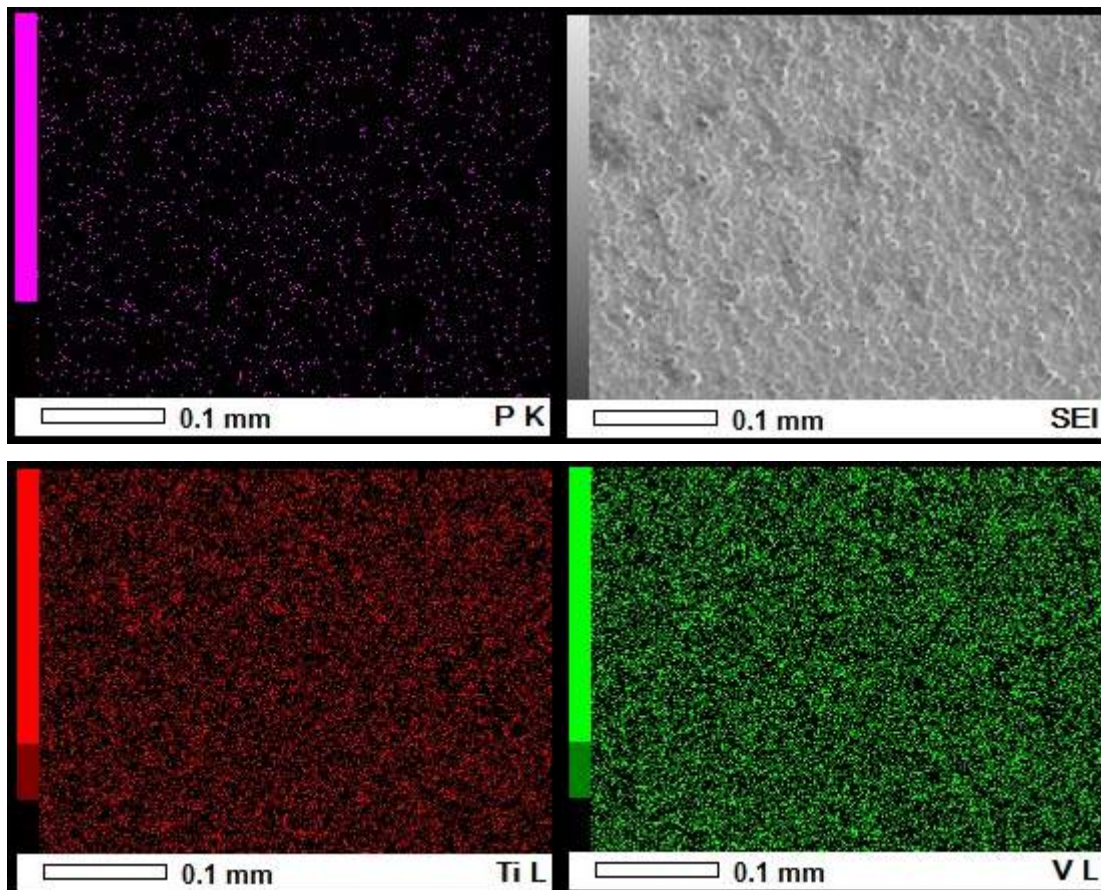
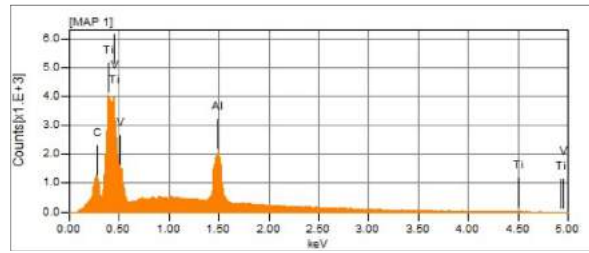
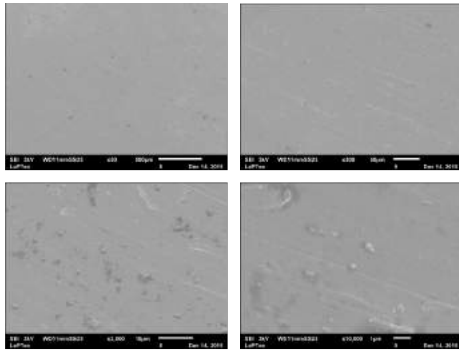


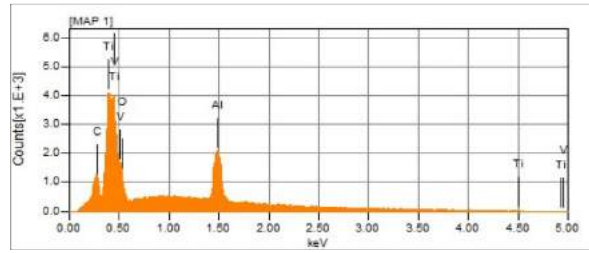
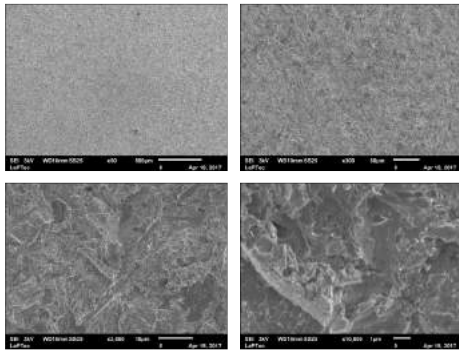
Figura 17 - Mapa de cores mostrando a distribuição dos constituintes da liga Ti-6Al-4V com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) pela técnica de EDS.

Nas figuras 18, 19 e 20 é possível avaliar por meio da MEV/EDS, a topografia de superfície dos discos e implantes usinados (USINADOS), AC e PEO, em diferentes ampliações, tanto no período baseline bem como após a remoção dos implantes (no estudo *in vivo*).

Discos Usinados



Discos Jateado/AC



Discos PEO

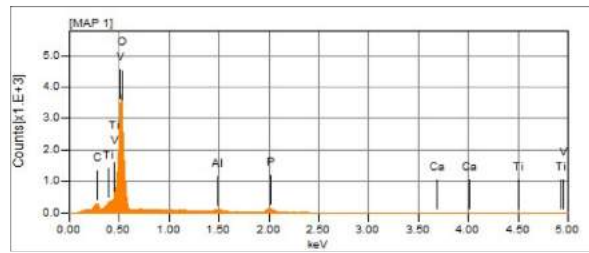
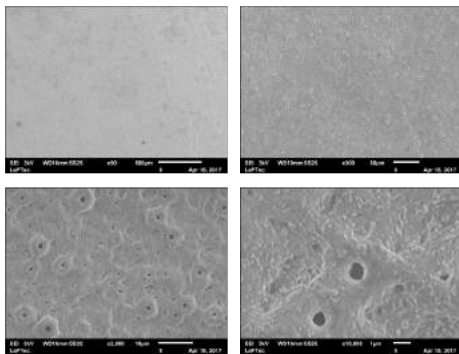


Figura 18 - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos discos da liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO.

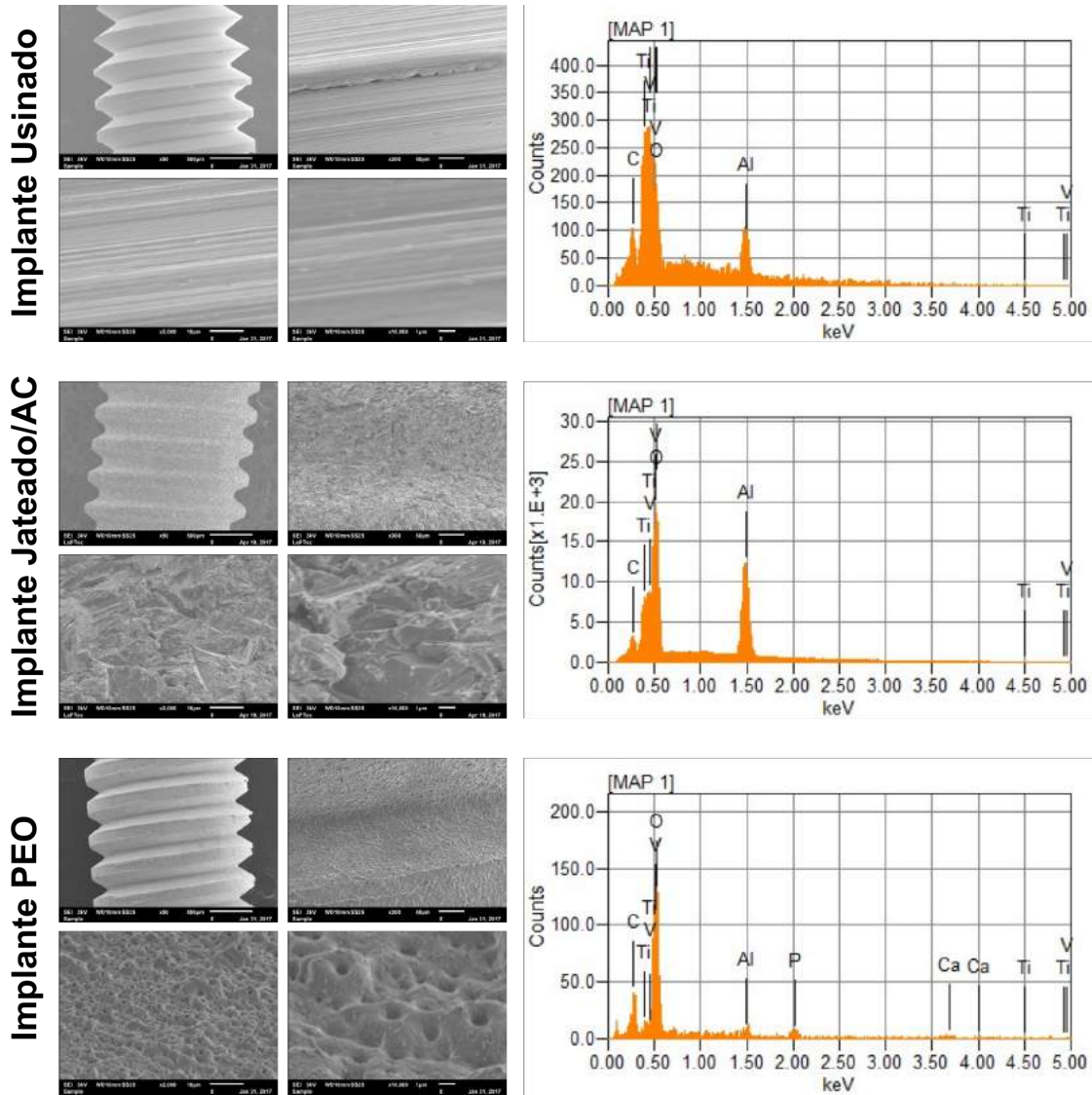
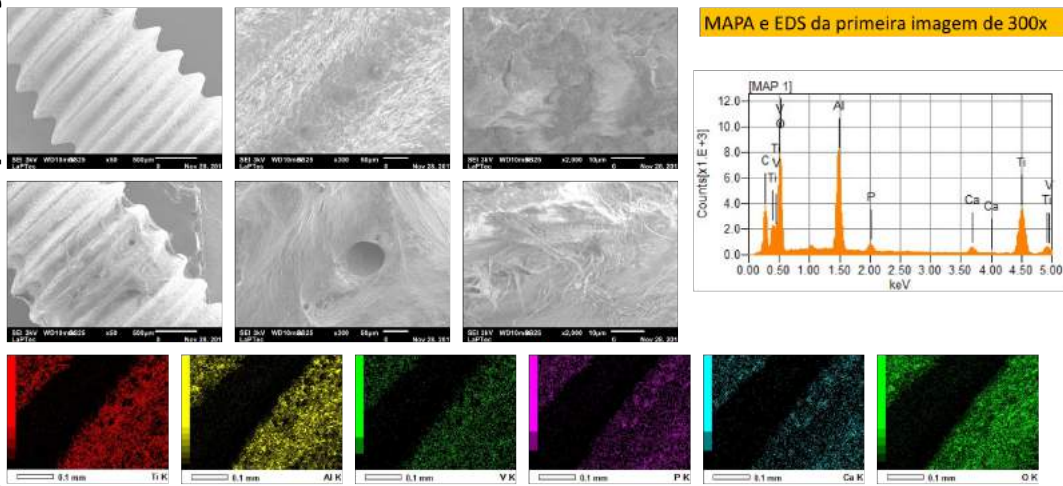


Figura 19 - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, 2.000x e 10.000x dos implantes de liga Ti-6Al-4V com a superfície usinada (antes da texturização) e texturizadas por AC e PEO, no período baseline.

Implante Jateado/AC após remoção



Implante PEO após remoção

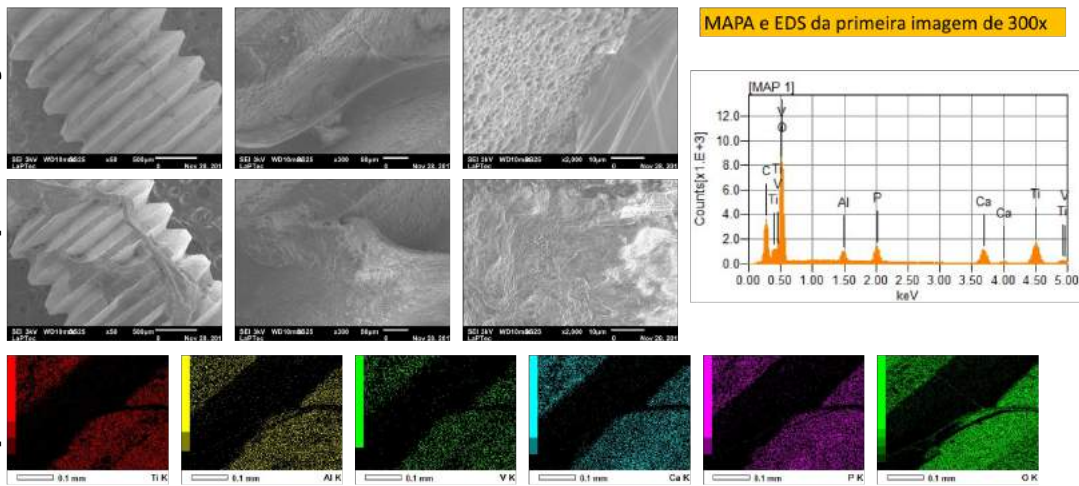


Figura 20 - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura (MEV)/EDS nas magnitudes de 50x, 300x, e 2.000x e mapa de cores dos implantes de liga Ti-6Al-4V com as superfícies texturizadas por AC e PEO, no período de caracterização das superfícies (antes da remoção) e após o torque reverso (biomecânica: remoção dos implantes)

Energia livre de superfície e ângulo de contato

A energia livre de superfície dos espécimes analisados evidenciou variação dos resultados de $55,12 \pm 0,01$ a $61,17 \pm 0,01$. Estes valores sugerem que o processo de texturização empregado (PEO) promove hidrofiliabilidade na superfície das amostras. Independente do período analisado nas amostras PEO (antes ou após a esterilização em raios gama), mesmo apresentando após a esterilização, diminuição da energia de superfície e aumento do ângulo de contato, sempre as amostras do grupo PEO apresentaram resultados melhores com comparação ao jateamento e ataque ácido (AC),

um método comercialmente disponível, aqui considerado como grupo controle (positivo). Estes dados podem ser observados e comparados nas Figuras 21 a 22.

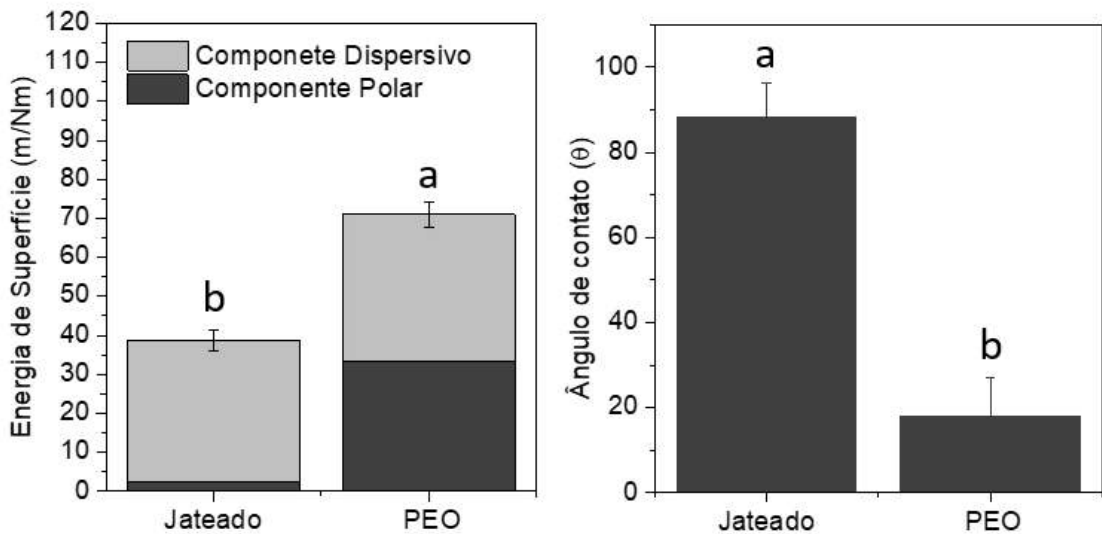


Figura 21 - Energia de superfície e ângulo de contato com a água feito logo após o tratamento com PEO.

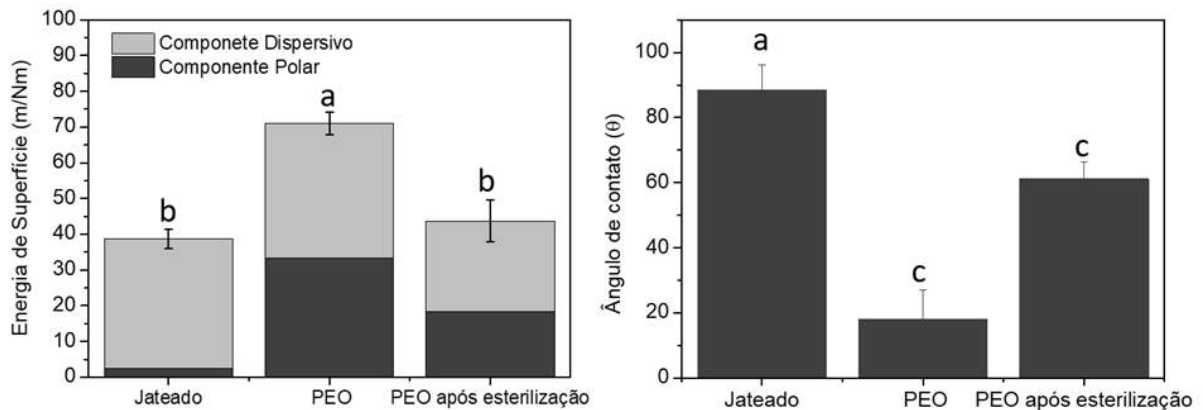


Figura 22 - Energia de superfície e ângulo de contato - Amostras Jateadas/ácido (AC), PEO e PEO após esterilização.

Perfilometria (Rugosidade de superfície)

Os dados médios representativos dos valores de Ra, Rq, Rt e Rz podem ser visualizados na figura 18. Independente do parâmetro de rugosidade analisado, não houve diferenças entre os dois métodos de texturização analisados (PEO e AC) ($p > 0,05$, teste ANOVA). A rugosidade média (Ra), padrão de comparação nos estudos de caracterização topográfica superficial, apresentou valores médios para as amostras ácido/jateadas na ordem de $0,38 \pm 0,03 \text{ um}^2$ e para o grupo PEO, $0,39 \pm 0,05 \text{ um}^2$ (Figura 23).

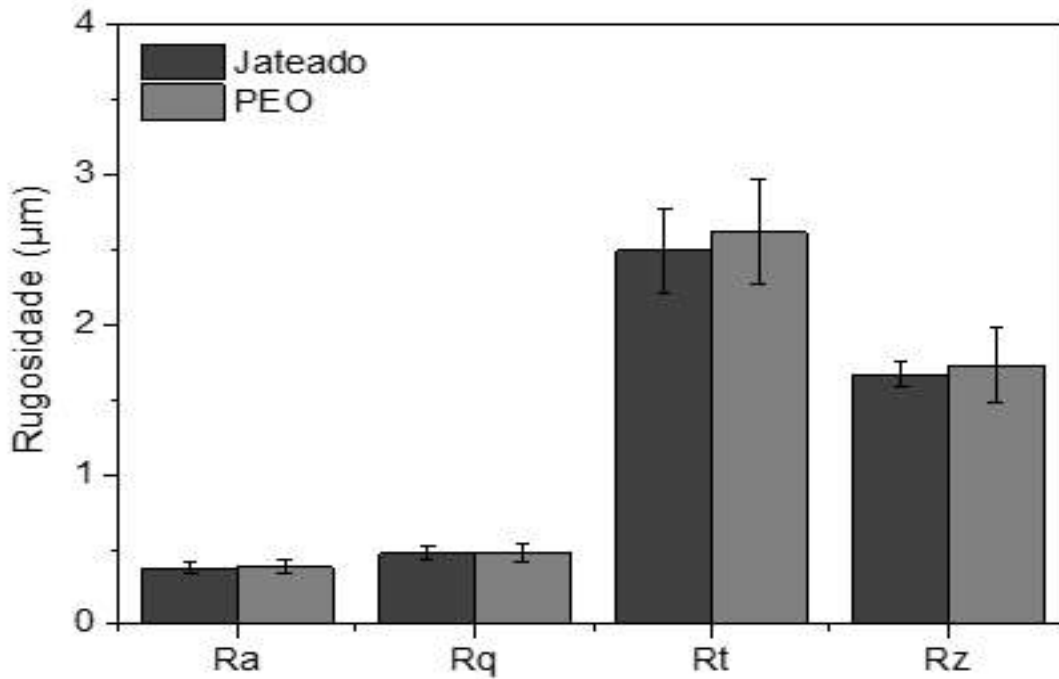


Figura 23 – Valores médios e desvio padrão representativos da rugosidade de superfície para os discos ácido/jateados (AC) e PEO: Ra ($p = 0,701$) / Rq ($p = 0,929$) / Rt ($p = 0,555$) / Rz ($p = 0,614$).

4.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno

A dosagem de estrógeno, após os procedimentos de ovariectomia (OVX), da cirurgia fictícia (SHAM) ou para a senilidade das ratas mostrou para o grupo SHAM os maiores valores, seguida do grupo SENIL e o menor valor para OVX ($p = 0,0003$) (Figura 24).

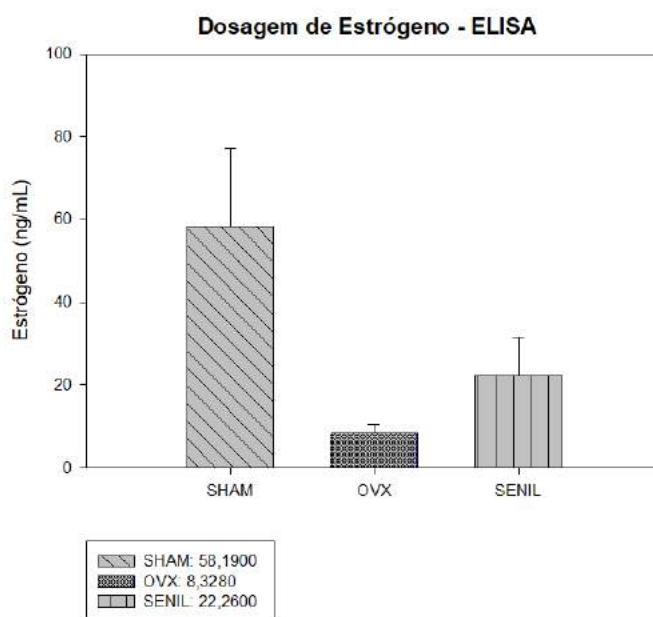


Figura 24 - Imagem gráfica da dosagem média de estrógeno pelo método ELISA para os grupos SHAM, OVX e SENIL.

4.3 Estudo ex-in vivo

Crescimento e Viabilidade Celular

Os valores representativos atribuídos na análise de crescimento e viabilidade celular, foram separados por grupos dos animais (SHAM, OVX e SENIL).

Na comparação entre os grupos testes de superfícies no grupo SHAM, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC e PEO x CONTROLE, ambos apresentaram $p < 0.001$, e na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística ($p 0.673$).

O fator de comparação TEMPO (3,7 e 10 dias) intergrupo CONTROLE não apresentou significância estatística. No grupo AC, houve apenas significância estatística ($p 0.003$) na comparação entre 3 e 10 dias. O grupo PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias ($p 0.001$) e 7 x 10 dias ($p 0.001$) (Figura 25).

Viabilidade Celular - Grupo SHAM

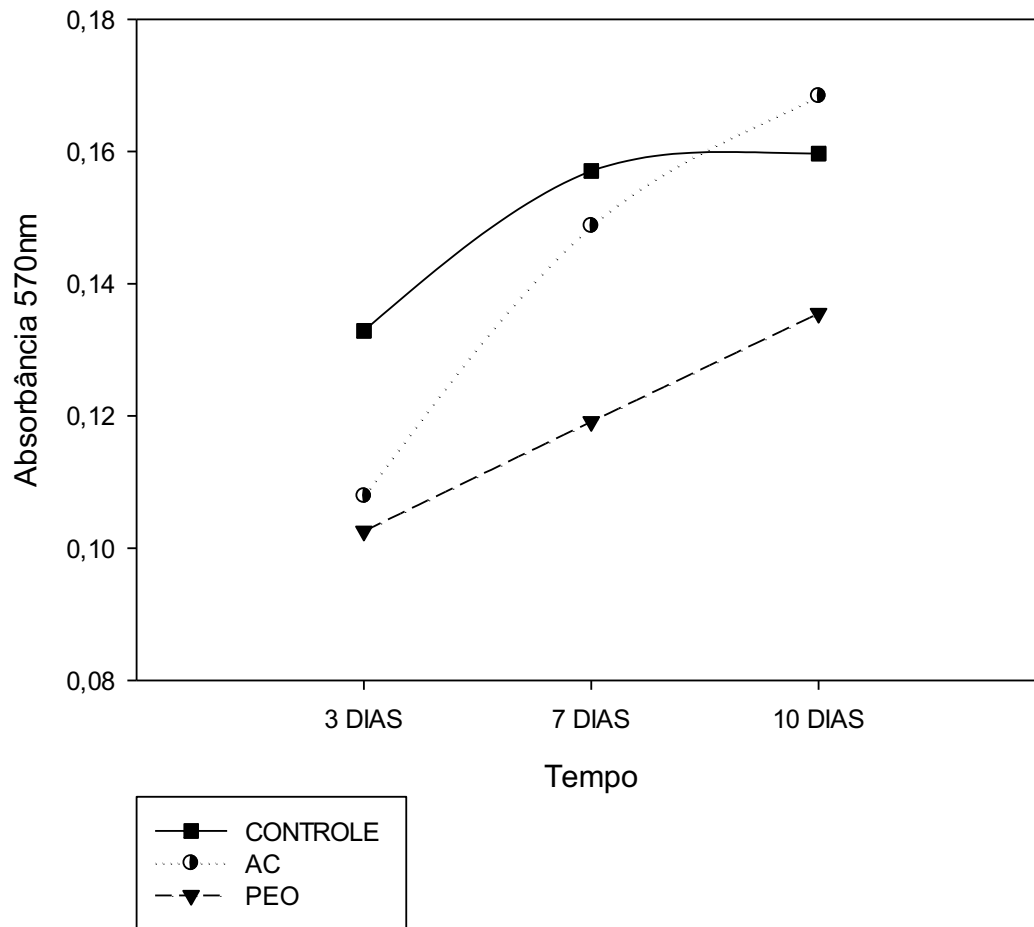


Figura 25 – Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE $0,132 \pm 0,028$; Superfície AC $0,107 \pm 0,016$; Superfície PEO $0,102 \pm 0,012$. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE $0,157 \pm 0,022$; Superfície AC $0,148 \pm 0,012$; Superfície PEO $0,119 \pm 0,009$. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE $0,159 \pm 0,010$; Superfície AC $0,168 \pm 0,001$; Superfície PEO $0,135 \pm 0,017$.

No grupo OVX, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC (p 0.001) e PEO x CONTROLE (p 0.002), na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística (p 0.970).

O fator de comparação TEMPO intergrupo CONTROLE, apresentou significância estatística na comparação 3 x 10 dias (p 0.001) e 7 x 10 dias (p 0.001). No grupo AC, houve apenas significância estatística (p 0.028) na comparação entre 3 e 10 dias. O grupo

PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias (p 0.014) e 7 x 10 dias (p 0.010) (Figura 26).

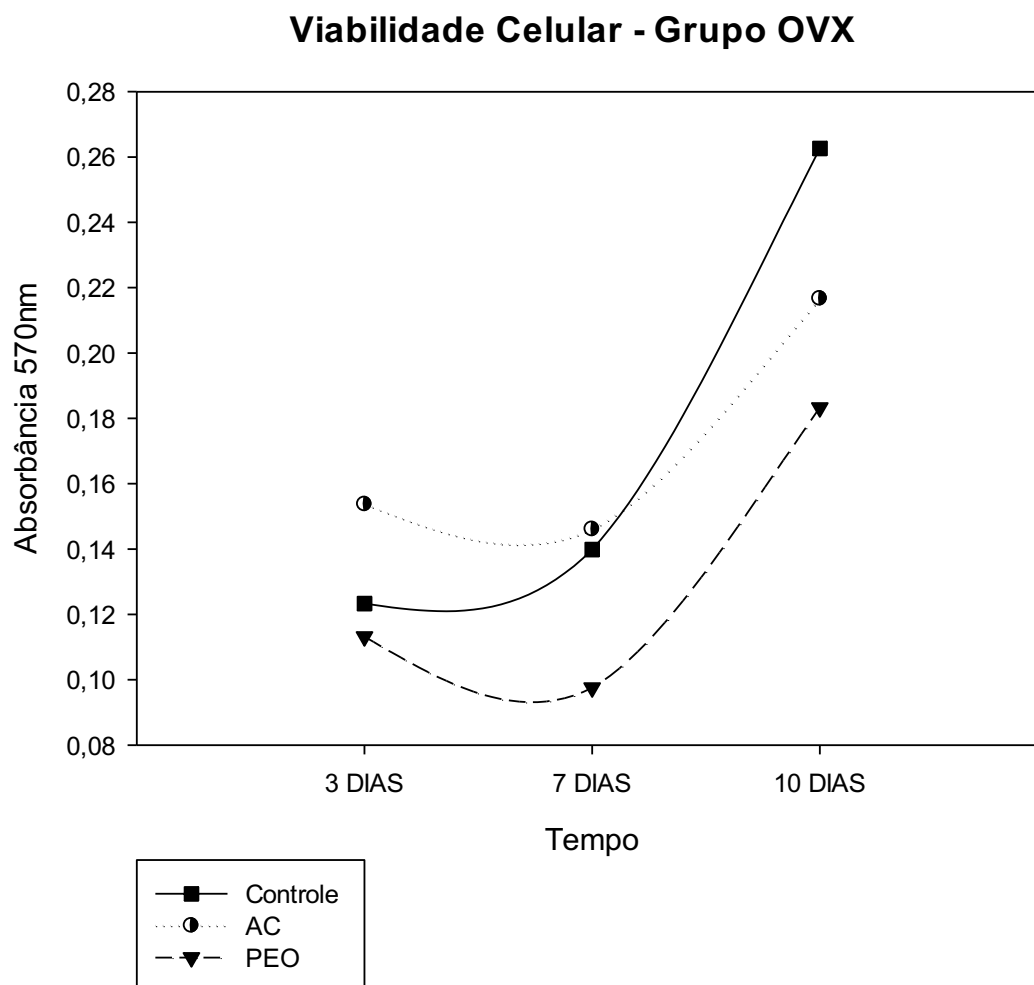


Figura 26 – Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SHAM. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE 0,132+0,028; Superfície AC 0,107+0,016; Superfície PEO 0,102+0,012. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE 0,157+0,022; Superfície AC 0,148+0,012; Superfície PEO 0,119+0,009. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE 0,159+0,010; Superfície AC 0,168+0,001; Superfície PEO 0,135+0,017.

No grupo SENIL, a significância estatística foi encontrada nos grupos PEO x AC (p 0.001) e PEO x CONTROLE (p 0.001), na comparação dos grupos AC x CONTROLE não apresentou diferença estatística (p 0.473).

O fator de comparação TEMPO intergrupo CONTROLE, apresentou significância estatística na comparação 7 x 10 dias (p 0.006). No grupo AC, houve significância estatística em todas as comparações de tempo. O grupo PEO a significância estatística foi presente na comparação entre 3 x 10 dias (p <0.001) e 7 x 10 dias (p 0.004) (Figura 27).

Viabilidade Celular - Grupo Senil

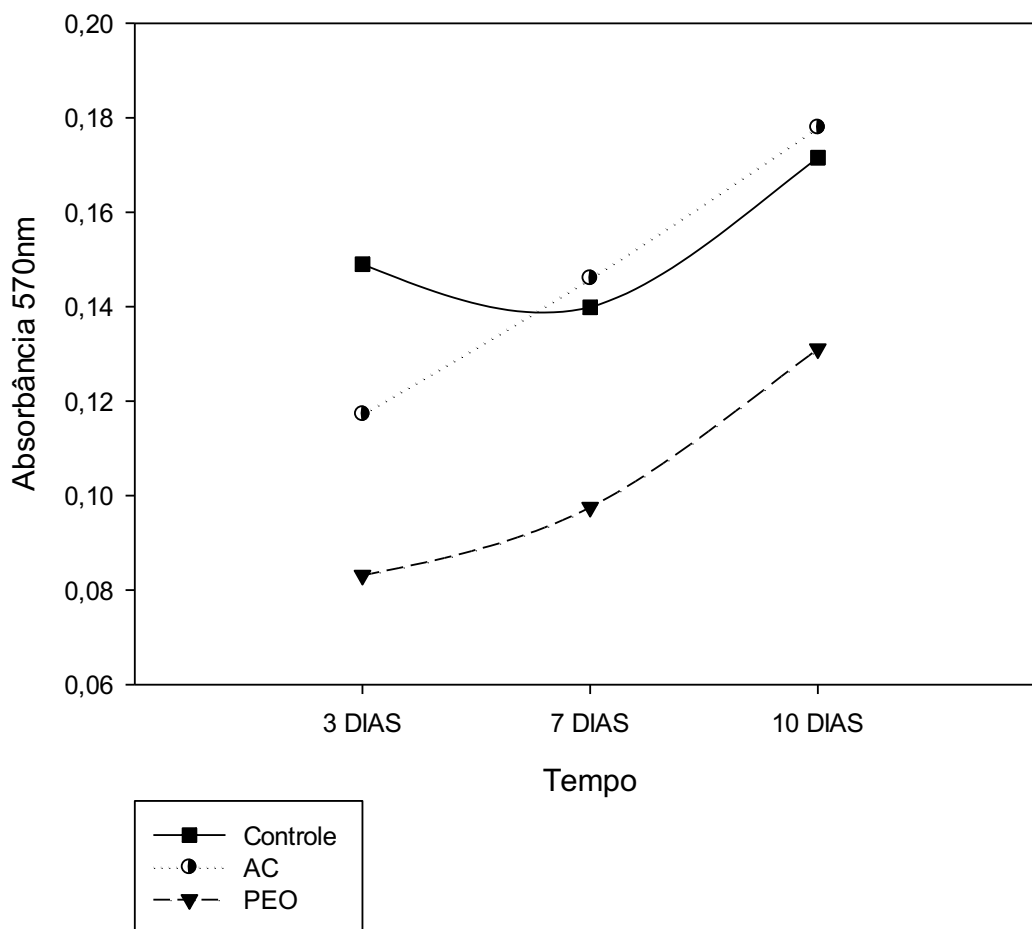


Figura 27 – Imagem gráfica - Viabilidade Celular para o Grupo SENIL. Período de 3 dias: Superfície CONTROLE $0,149 \pm 0,018$; Superfície AC $0,117 \pm 0,008$; Superfície PEO $0,083 \pm 0,005$. Período de 7 dias: Superfície CONTROLE $0,139 \pm 0,006$; Superfície AC $0,146 \pm 0,008$; Superfície PEO $0,097 \pm 0,013$. Período de 10 dias: Superfície CONTROLE $0,171 \pm 0,004$; Superfície AC $0,177 \pm 0,017$; Superfície PEO $0,131 \pm 0,010$.

Análise por PCR em tempo real

Como resultado da expressão gênica dos 6 genes analisados nas CTMs-MO no grupo SHAM (Figura 28), os discos com tratamento de superfície PEO apresentou maior expressão da Runx2 (p 0,102) e OPN (p 0,156). A superfície AC apresentou expressão maior nos genes SP7 (p 0,156), ALP (p 0,102), BSP (p 0,102) e OC (p 0,102).

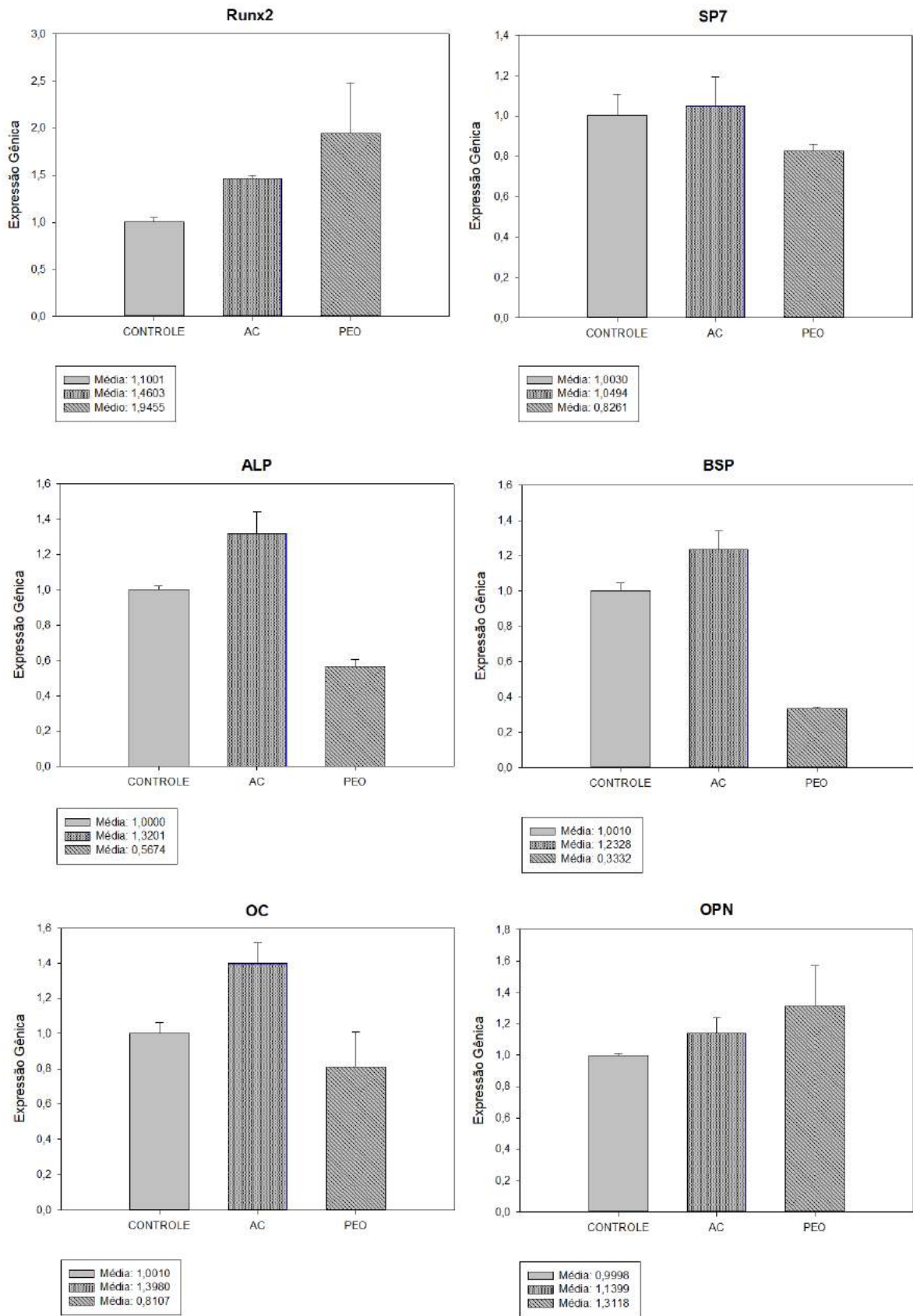


Figura 28 – Expressão gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SHAM.

As CTMs-MO do grupo OVX (Figura 29) apresentou nos discos com o tratamento de superfície AC maior expressão dos genes Runx2 (p 0,102), ALP (p 0,102), BSP (p 0,102), OC (p 0,102) e OPN (p 0,102). O gene SP7 (p 0,102) apresentou maior expressão na superfície PEO.

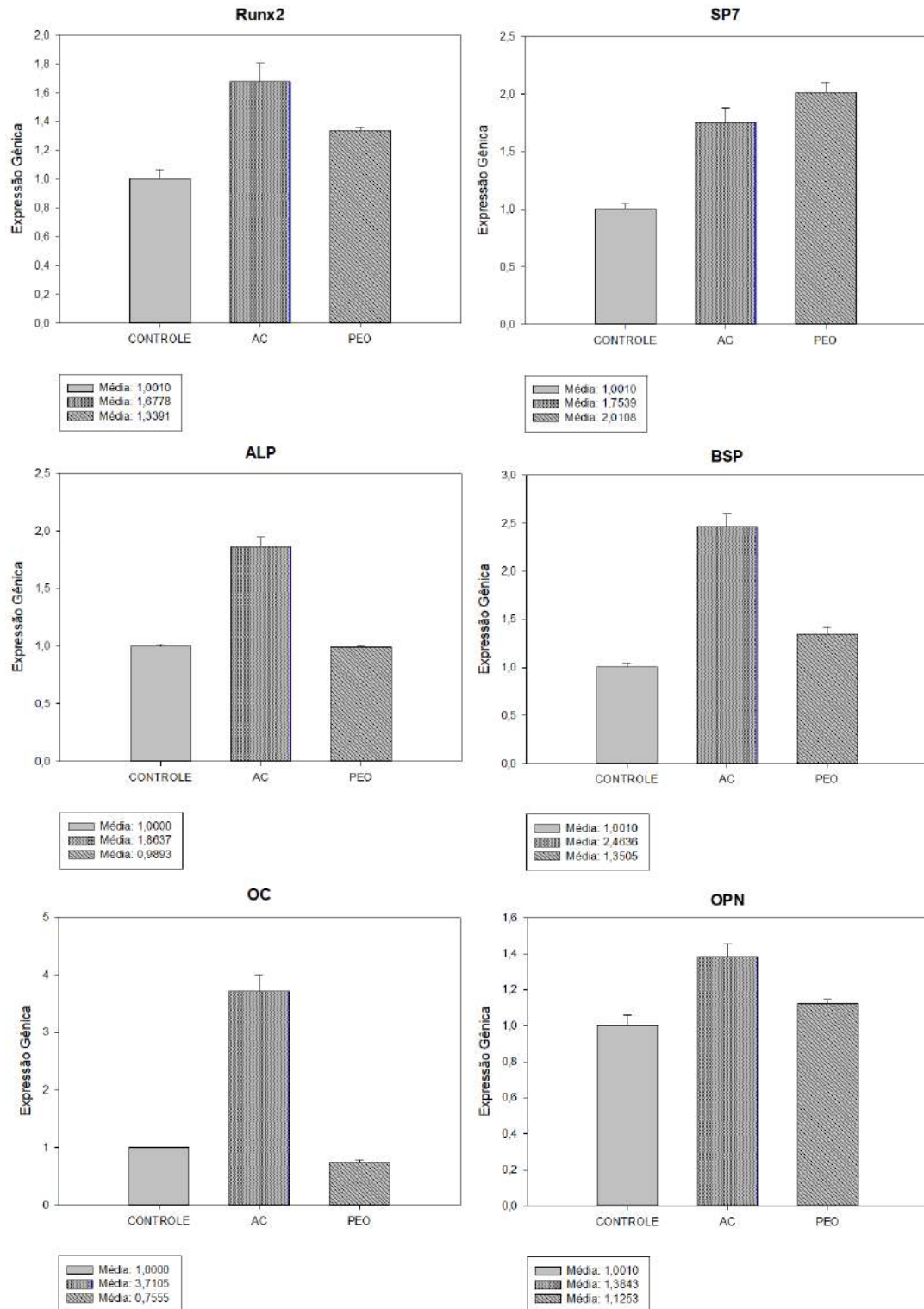


Figura 29 – Imagem gráfica – Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo OVX.

O grupo SENIL (Figura 30), apresentou maior expressão gênica da Runx2 (p 0,102), ALP (p 0,102) e OC (p 0,089) no grupo de discos CONTROLE. O grupo de superfície de discos AC apresentou maior expressão nos genes SP7 (p 0,102), BSP (p 0,102) e OPN (p 0,102).

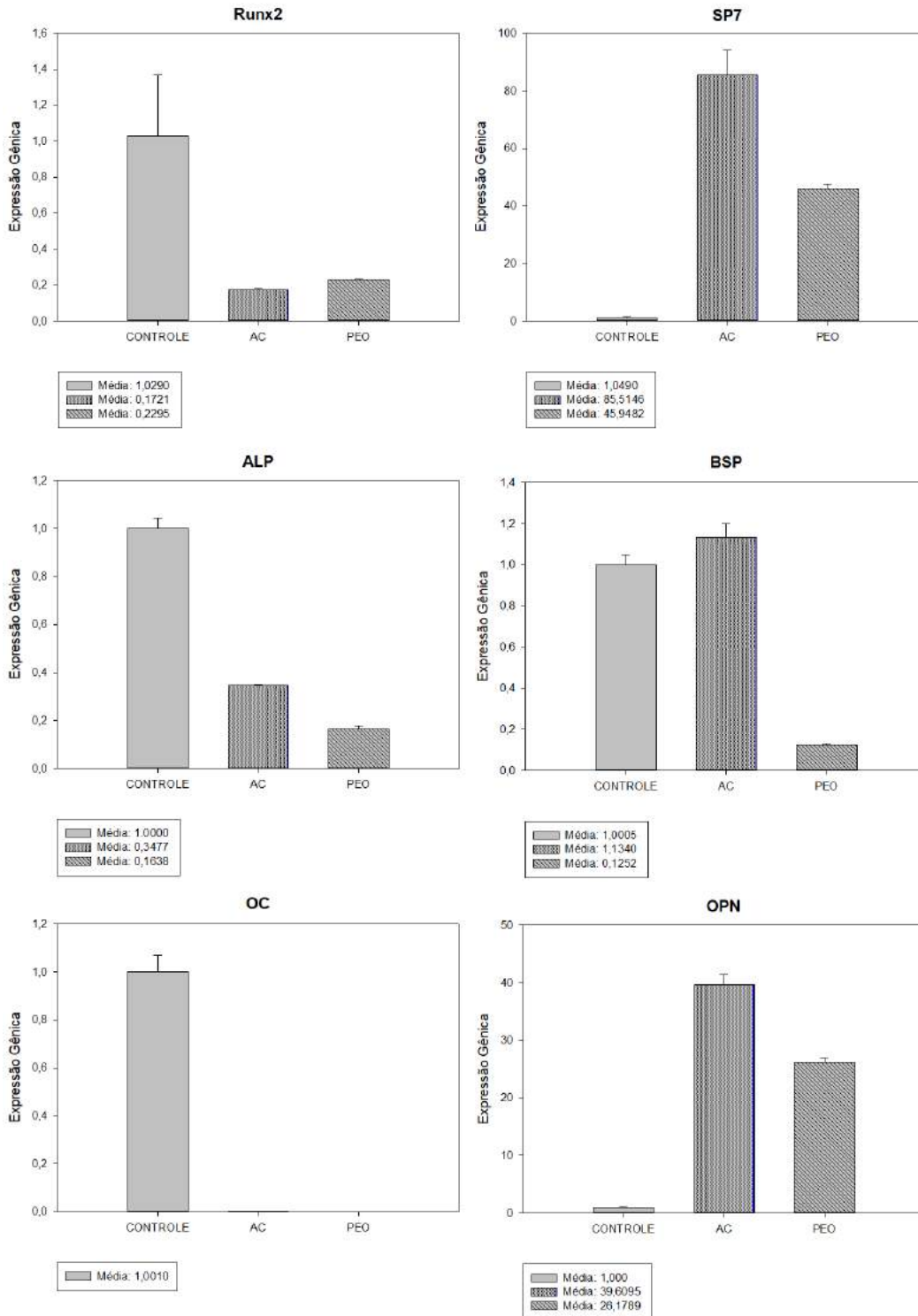


Figura 30 – Imagem gráfica – Expressão Gênica por PCR em Tempo Real para o Grupo SENIL.

Análise por Imunofluorescência

As proteínas osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) foram expressas através da coloração vermelha, com presença de marcação nas regiões do núcleo celular (coloração azul) e no citoesqueleto celular (coloração verde) (Figuras 31 a 33).

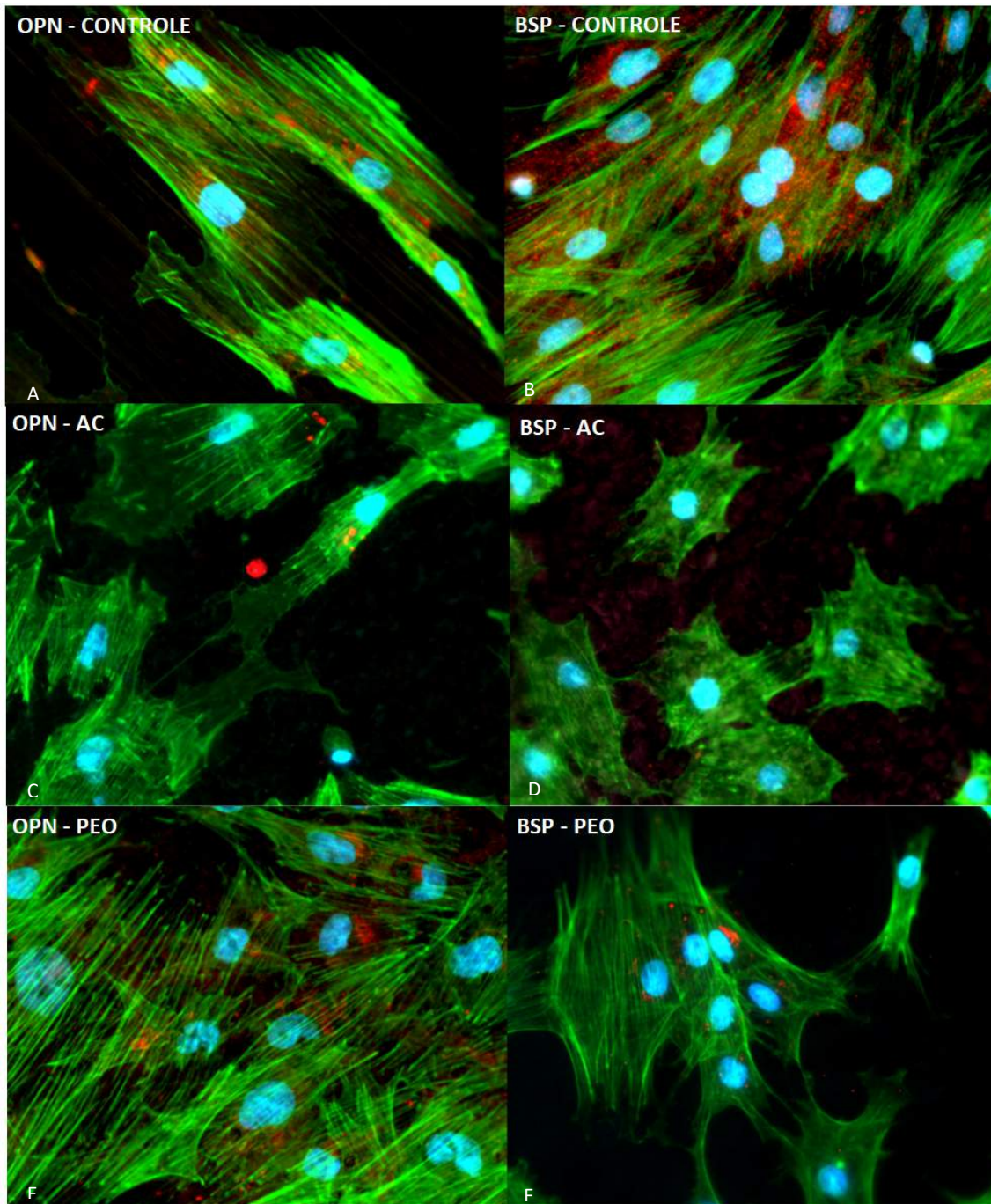


Figura 31 – Grupo SHAM: Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A, C e D); Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular (B), nenhuma expressão da BSP (D) e pouca expressão no núcleo (F).

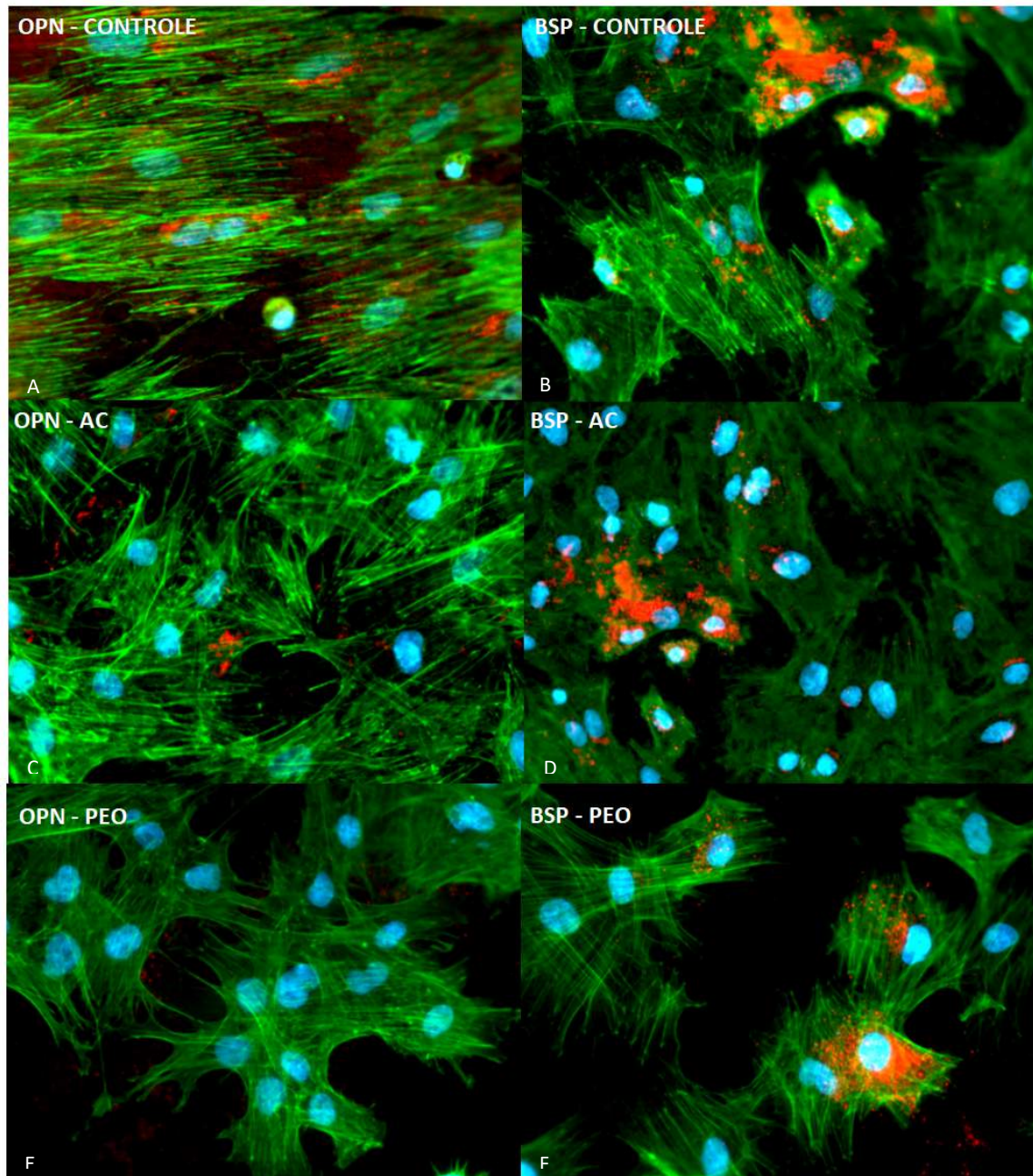


Figura 32 - Grupo OVX: Expressão da proteína OPN como grânulos no citoesqueleto e núcleo celular (A); Pouca expressão de OPN (C) e nenhuma expressão detectada (E); Expressão da proteína BSP predominante no citoesqueleto celular e no núcleo (B,D e F).

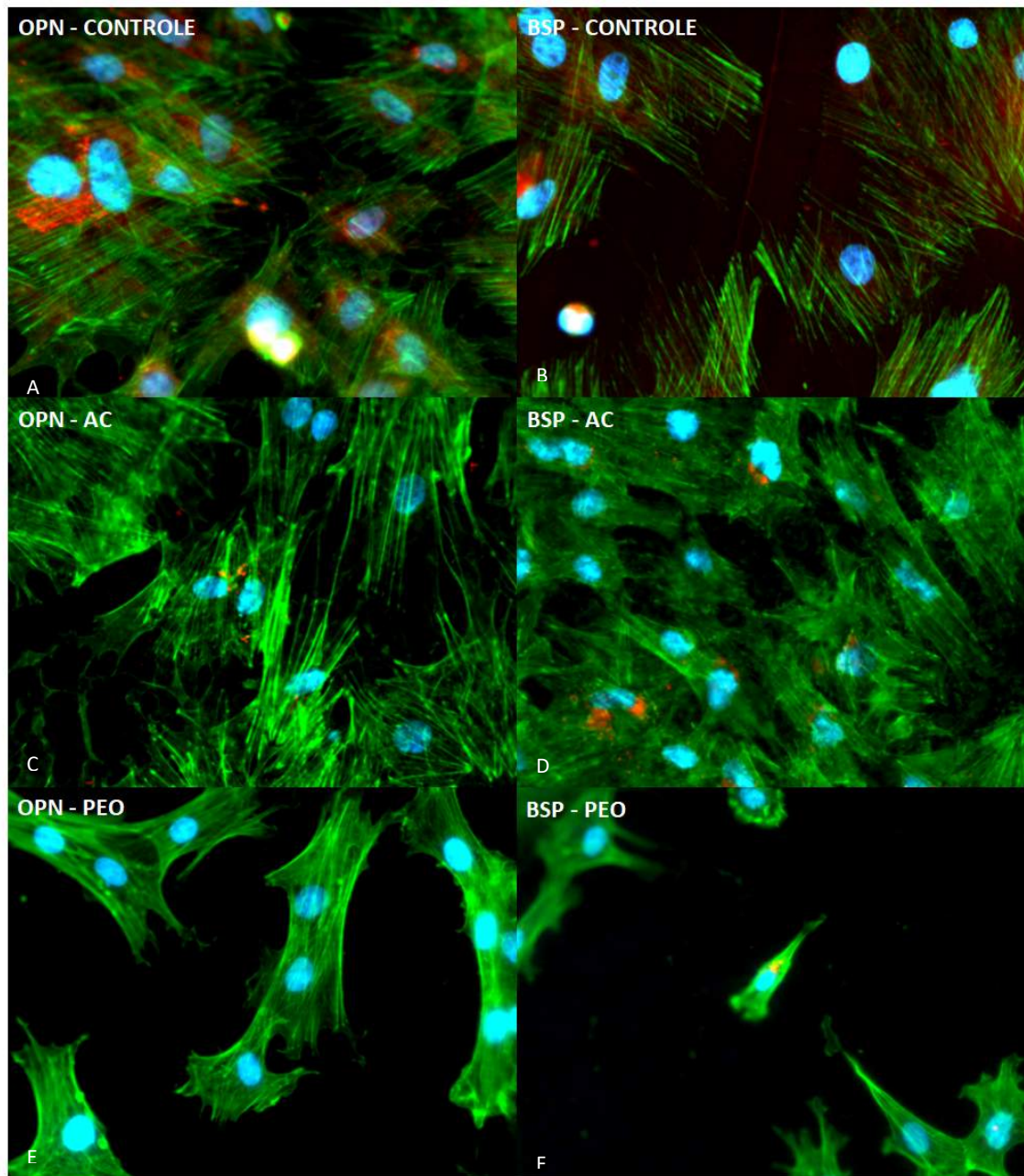


Figura 33 - Grupo SENIL: Expressão das proteínas OPN e BSP no citoesqueleto e núcleo celular (A e B); pouca expressão das proteínas OPN e BSP (C e D); nenhuma expressão das proteínas (E e F).

Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina apresentou um perfil diferente entre as culturas, ocorrendo em maior expressão na superfície PEO no grupo SHAM e uma maior expressão na superfície controle no grupo OVX.

A avaliação da ALP no grupo de células SHAM, apresentou diferença estatística na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.002$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.014$). Não apresentando diferença na comparação entre os grupos Controle x AC ($p > 0.079$).

O grupo de células OVX, houve diferença na comparação entre os grupos Controle x AC ($p < 0.004$) e Controle x PEO ($p < 0.003$), não apresentando diferença estatística na comparação das superfícies PEO x AC ($p > 0,884$).

Para o grupo de células SENIL, as comparações entre os grupos não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0.082$) (Figura 34).

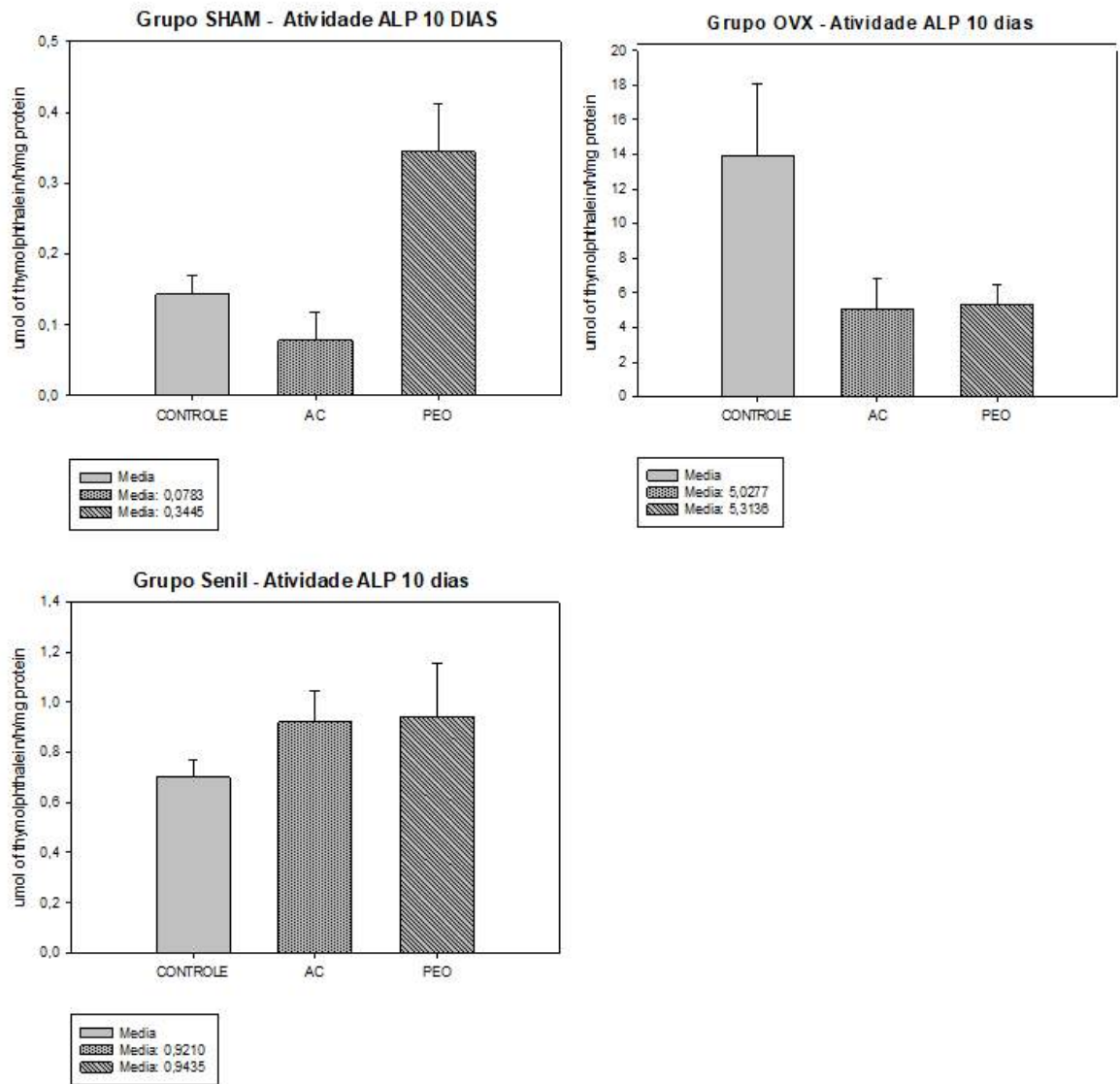


Figura 34 – Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) no período de 10 dias para os grupos SHAM, OVX e SENIL.

Análise da formação de osso mineralizado semelhante a nódulos

A superfície PEO apresentou uma formação de osso mineralizado maior em todos os grupos de cultura celular (SHAM, OVX e PEO).

Para a avaliação da mineralização no grupo de células SHAM, a análise apresentou significância na comparação dos grupos PEO e AC ($p < 0.05$) e nas demais comparações entre grupos, não houve diferença estatística significativa (Figura 35).

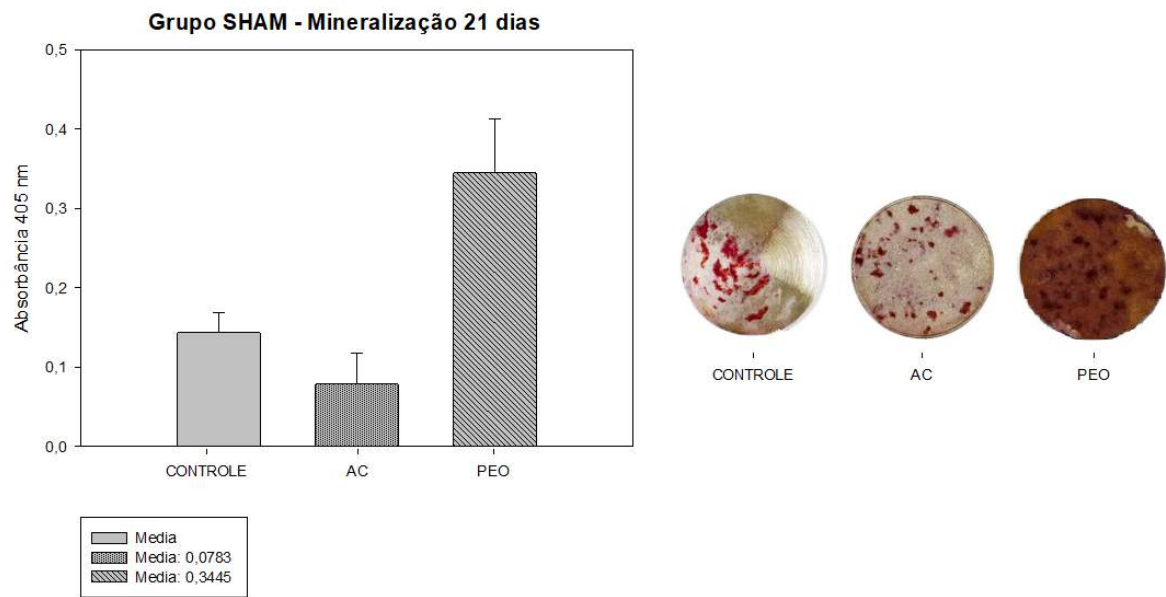


Figura 35 – Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SHAM. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.

No grupo de células OVX, a análise estatística apresentou significância na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.001$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.001$), não sendo encontrado diferença estatística significativa na comparação dos grupos Controle x AC (Figura 36).

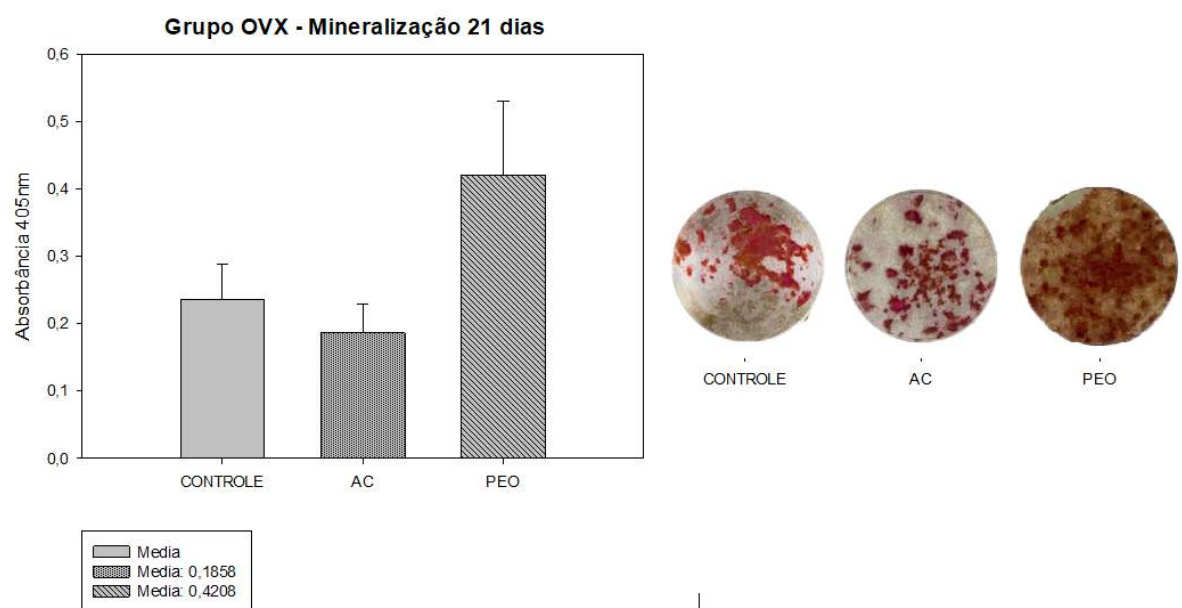


Figura 36 – Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo OVX. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.

Análise no grupo de células SENIL, a análise estatística apresentou significância na comparação dos grupos PEO x AC ($p < 0.05$) e nos grupos PEO x Controle ($p < 0.05$), não sendo encontrado diferença estatística significativa na comparação dos grupos Controle x AC (Figura 37).

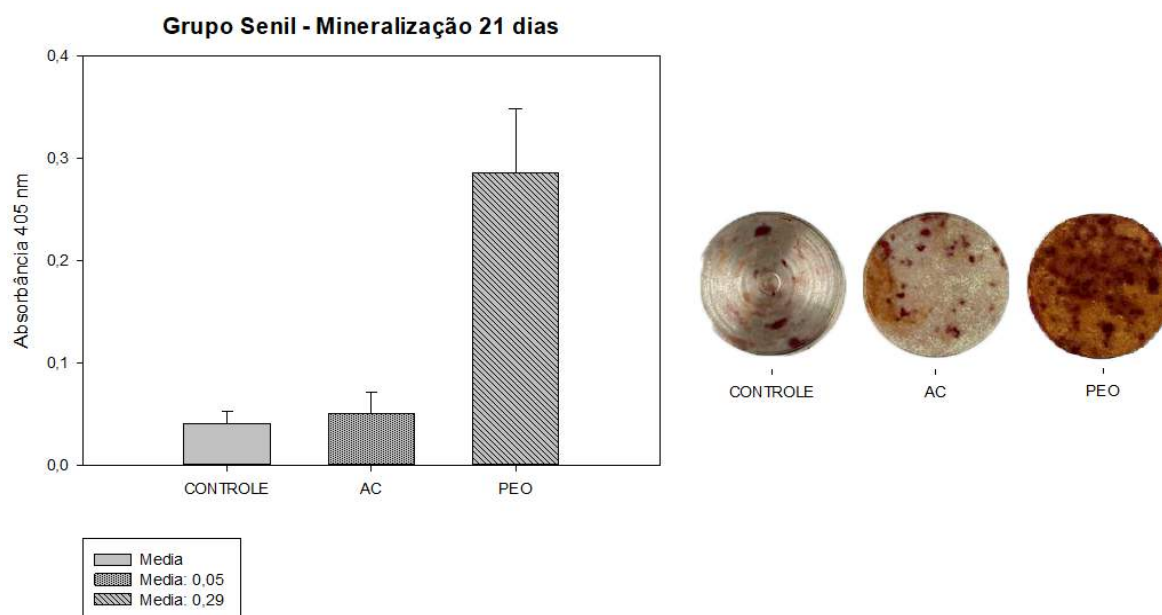


Figura 37 – Gráfico da formação de nódulos de mineralização Grupo SENIL. Discos dos grupos Controle, AC e PEO com formação de nódulos de mineralização coradas com Vermelho de Alizarina.

Como controle do experimento de mineralização, os discos dos grupos Controle, AC e PEO, foram submetidos ao experimento, sem a presença de células para verificação do grau de retenção do corante. Ambos os grupos não apresentaram um grau de retenção significativo do corante (Figura 38).

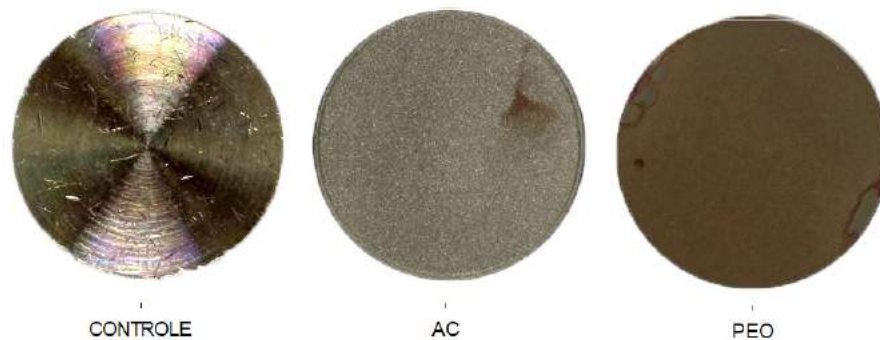


Figura 38 – Discos sem células cultivadas dos Grupos Controle, AC e PEO coradas com Vermelho de Alizarina para avaliação do grau de retenção do corante.

4.4 Estudo *in-vivo*

Parâmetros histológicos (coloração HE)

As fotomicrografias histológicas mostraram que na região de interface correspondente as espiras dos implantes, houve neoformação de tecido ósseo nos grupos experimentais analisados (SHAM, OVX e SENIL). Os grupos AC para as ratas SHAM e OVX apresentaram neoformação de tecido ósseo nas porções mais altas (picos) da interface osso/implante, enquanto que nas porções mais baixas (vales) da interface osso/implante uma presença maior de formação de tecido conjuntivo organizado. No grupo de ratas SENIL a neoformação de tecido ósseo em toda a topografia da região correspondente a espira dos implantes, com pouca quantidade de tecido conjuntivo organizado, tanto para AC quanto para PEO.

No grupo PEO, ao comparar com o grupo AC, apresentou melhor formação e maturação de tecido ósseo nos picos e vales e pouca presença de tecido conjuntivo para SHAM e OVX, e esta diferença foi mais discreta para o grupo SENIL (Figura 39).

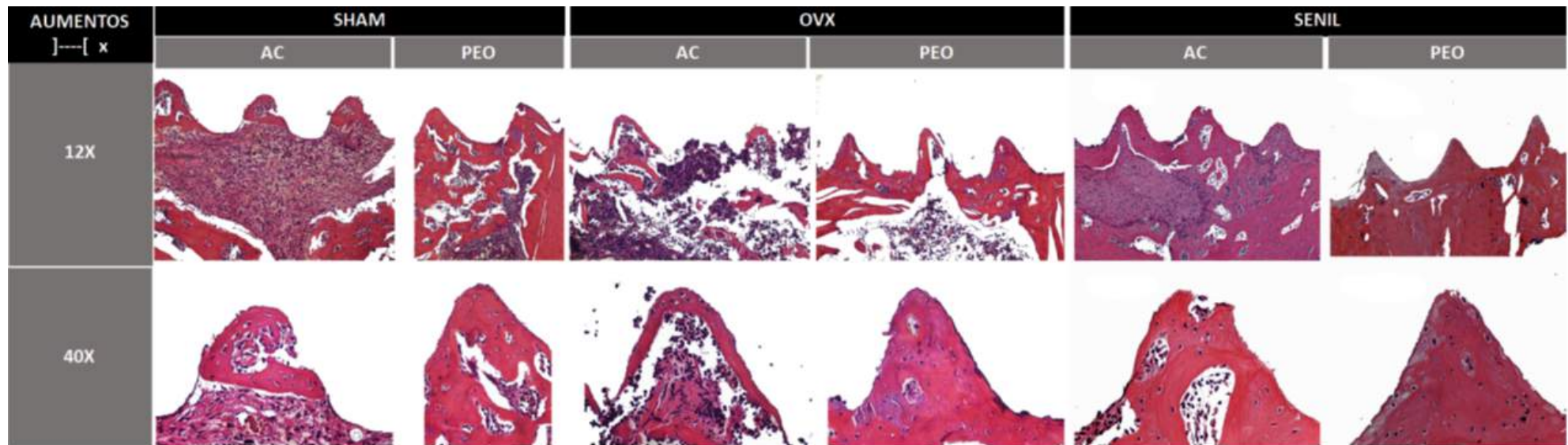


Figura 39 - Fotomicrografia dos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) em função dos métodos de texturização dos implantes (AC e PEO) na análise histológica pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) nos aumentos de 12x e 40x.

Parâmetros imunohistoquímicos

Grupo SHAM AC: OPG (1) – Marcação leve nas células do tecido ósseo, junto às espiras dos implantes; RANKL (1-2) – Havia mais marcações do que o observado para OPG, no entanto, não foi possível caracterizar como moderada. OC (1) – Marcação leve, discreta nas células do tecido ósseo; TRAP (1-2) - Não chega a ser moderada, mas há uma quantidade importante de osteoclastos marcados positivamente.

Grupo SHAM PEO: OPG (1) – Marcação leve, junto às células do tecido ósseo junto às espiras dos implantes; RANKL (2) - Marcação moderada, mostrando a presença desta proteína junto ao tecido ósseo em reparação; OC (1-2) - Conjuntivo marcado com Osteocalcina; TRAP (2) - Marcação moderada indicando presença de osteoclastos em atividade de reabsorção óssea (Figuras 40 a 43).

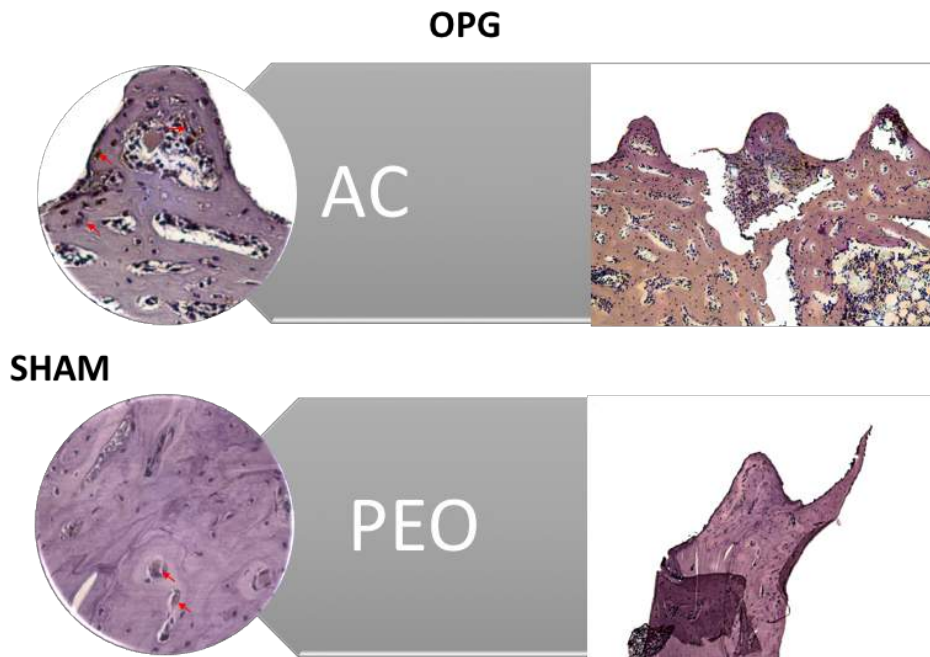


Figura 40 - Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1 (marcação leve). (Aumentos originais 12x e 40x). *marcações: setas em vermelho.

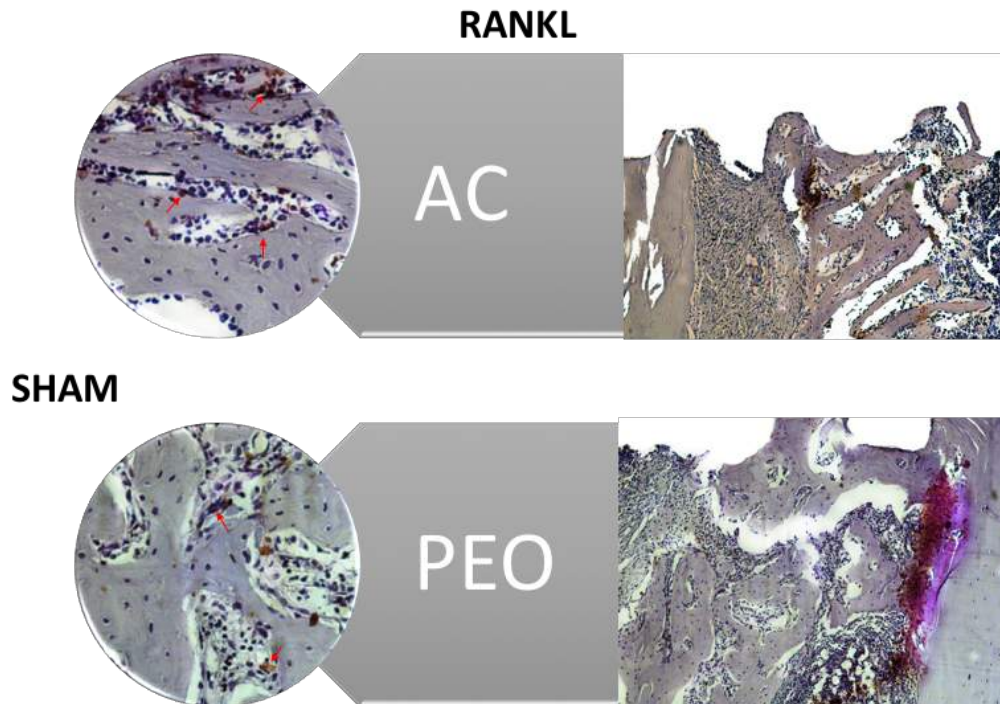


Figura 41 - Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína RANKL. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. * marcações: setas em vermelho.

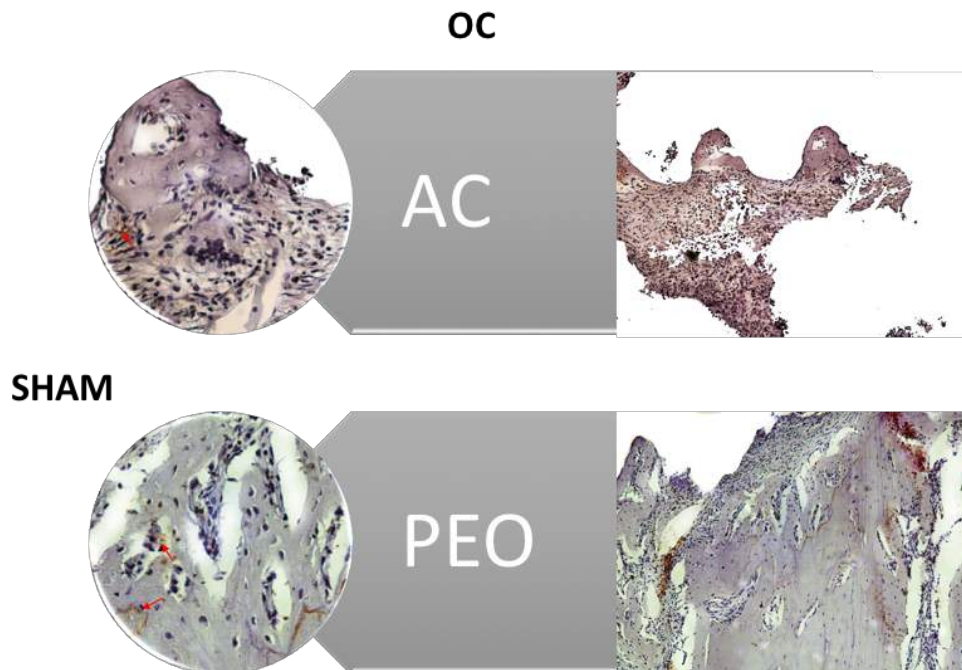


Figura 42 - Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SHAM AC: 1 (marcação leve); Grupo SHAM PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.

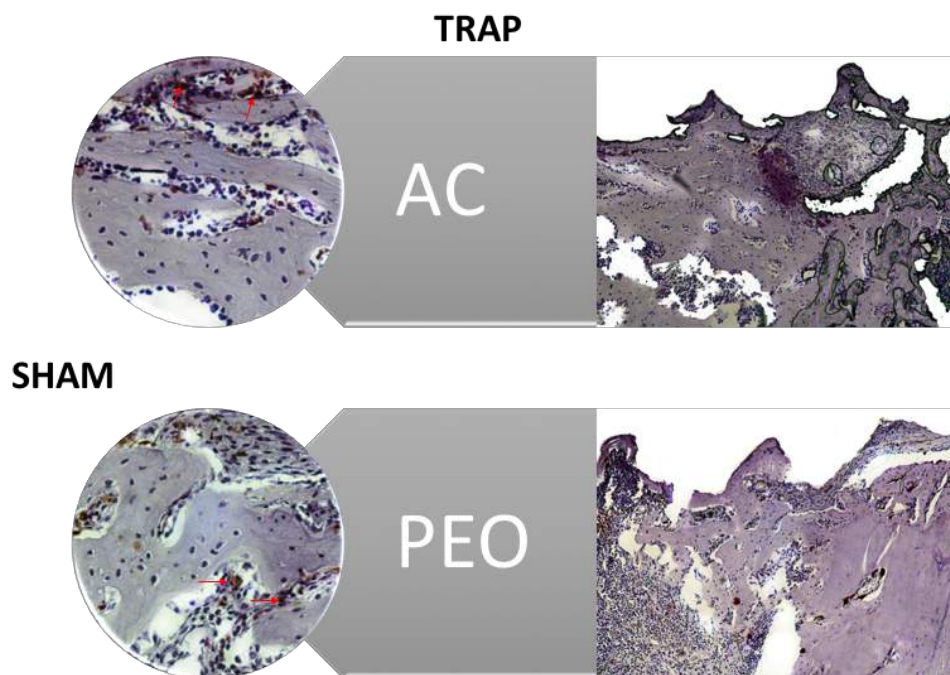


Figura 43 - Fotomicrografias do grupo experimental SHAM em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína TRAP. Grupo SHAM AC: 1-2 (marcação de leve à moderada); Grupo SHAM PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.

Grupo OVX AC: OPG (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína; RANKL (1) - discreta marcação para RANKL; OC (0-1) – marcação bastante discreta para esta proteína no campo analisado; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Grupo OVX PEO – OPG (2) – marcação moderada para esta proteína, junto a osteoblastos próximos às espiras dos implantes; RANKL (0-1) - marcação ausente à leve na interface osso-implante; OC (1-2), marcação de leve a moderada para osteocalcina, mostrando marcação desta proteína no tecido ósseo em reparação; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção (Figuras 44 a 47).

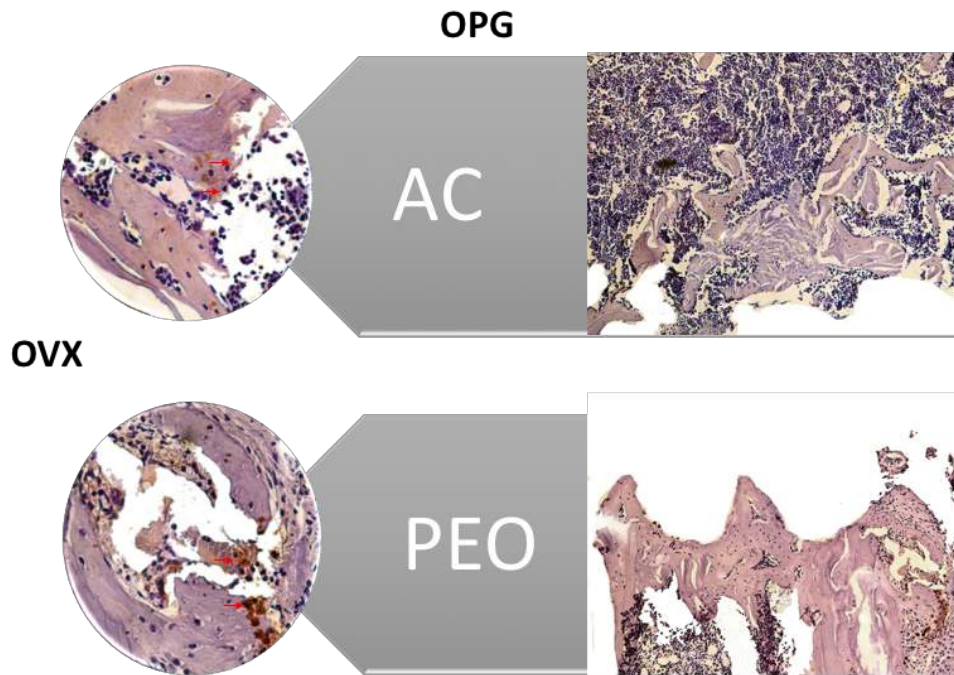


Figura 44 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo OVX AC: 0-1 (marcação ausente à leve); Grupo OVX PEO: 2 (marcação moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.

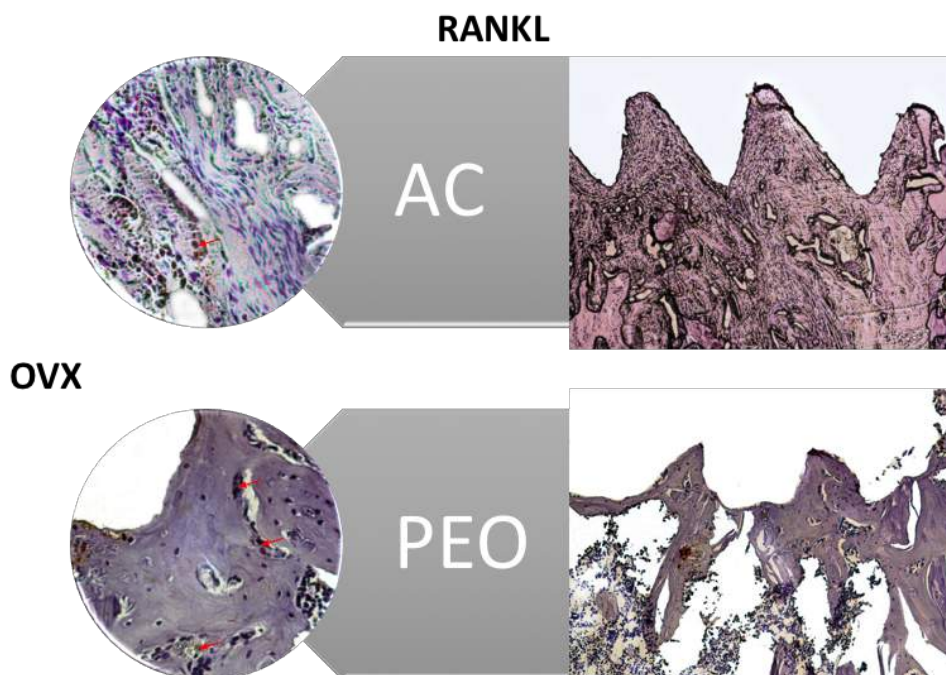


Figura 45 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína RANKL. Grupo OVX AC: 1 (marcação leve); Grupo OVX PEO: 0-1 (marcação ausente à leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.

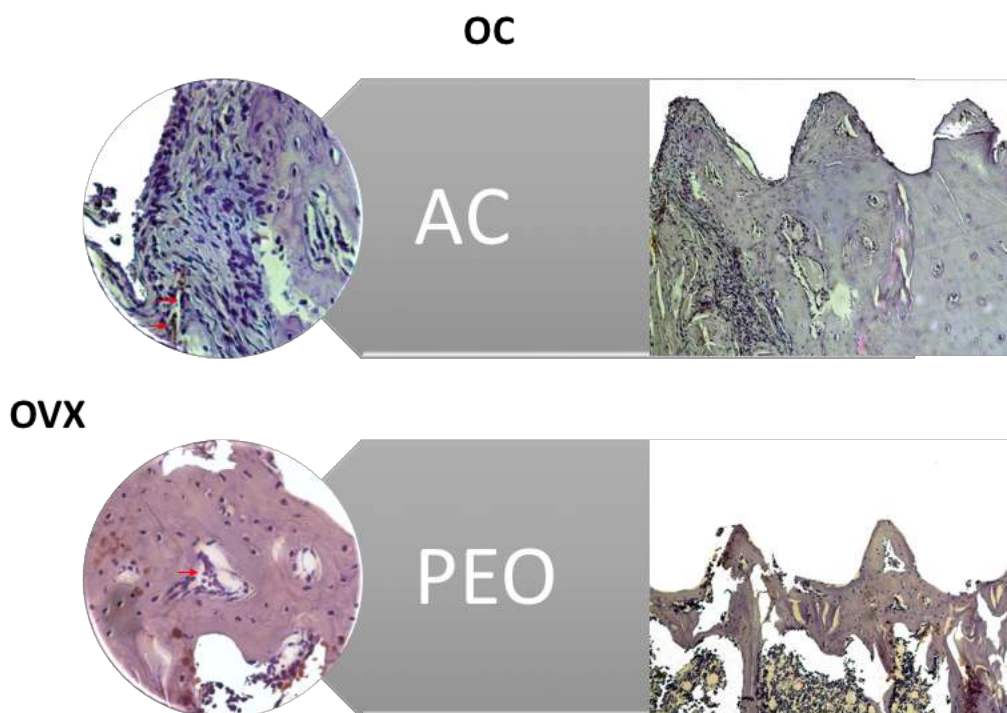


Figura 46 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo OVX AC: 0-1 (marção ausente à leve); Grupo OVX PEO: 1-2 (marção leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marções: setas em vermelho.

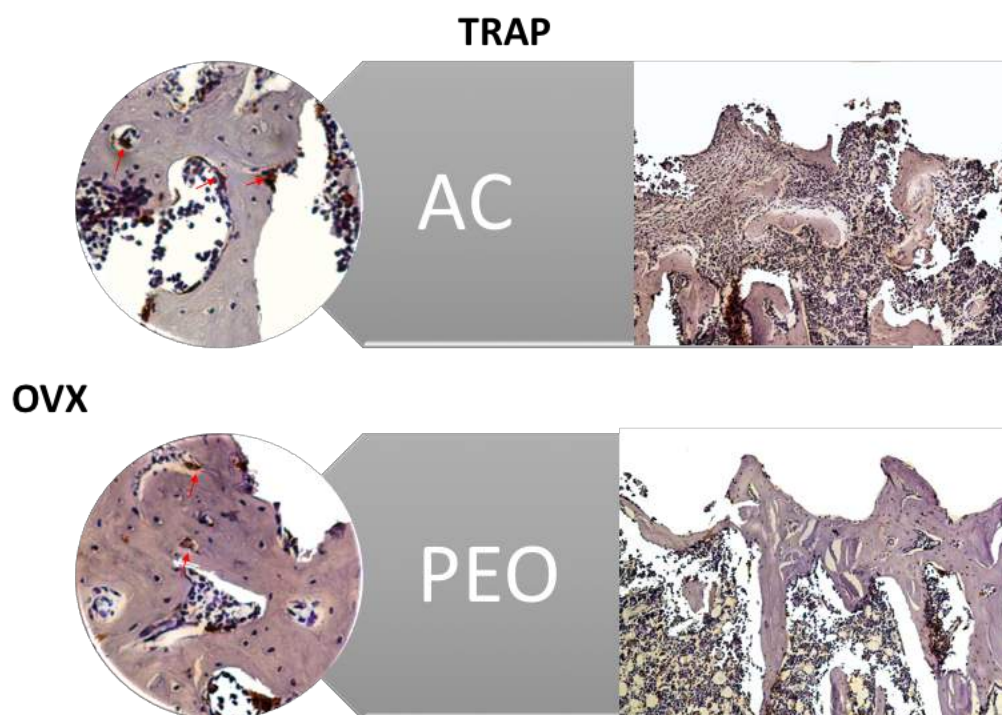


Figura 47 - Fotomicrografias do grupo experimental OVX em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína TRAP. Grupo OVX AC: 1-2 (marção leve à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marção leve)

à moderada); Grupo OVX PEO: 1-2 (marcação leve a moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.

Grupo SENIL AC: OPG (1) – marcação bastante discreta para esta proteína; RANKL (1-2) - marcação leve para moderada para RANKL; OC (1) – marcação bastante discreta para esta proteína no campo analisado; TRAP (1-2) – marcação quase moderada para osteoclastos em atividade de reabsorção.

Grupo SENIL PEO – OPG (1-2) – marcação leve para moderada para esta proteína; RANKL (1-2) - marcação moderada mais presentes na interface osso-implante; OC (1), marcação de leve para osteocalcina; TRAP (1) – marcação leve para osteoclastos em atividade de reabsorção na interface do implante (Figuras 48 a 51).

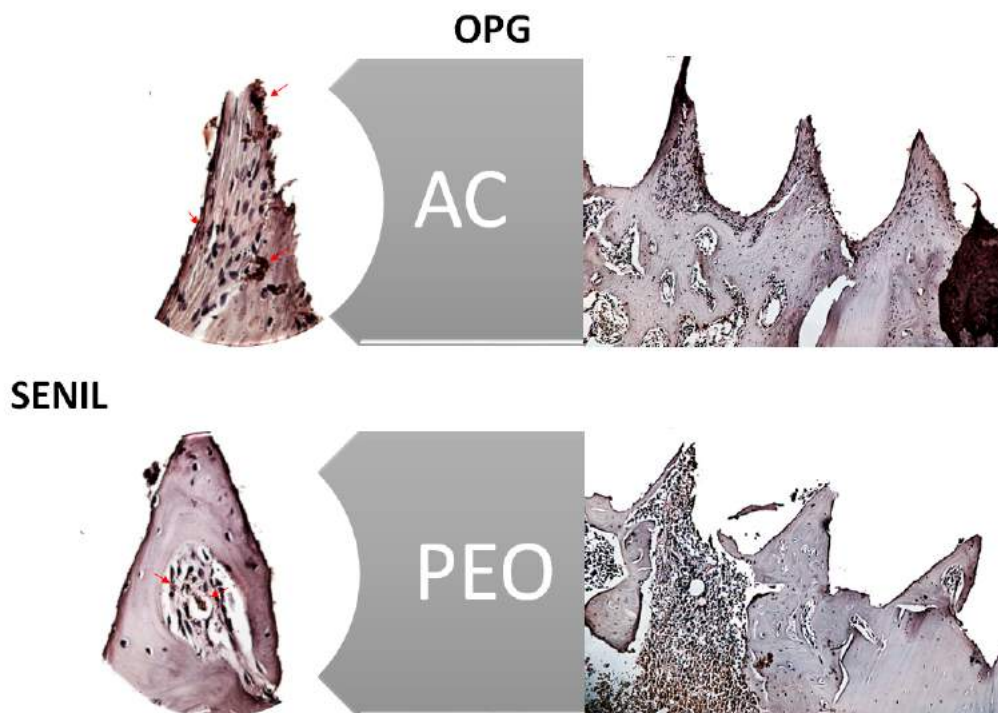


Figura 48- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcação positiva para proteína Osteoprotegerina (OPG). Grupo SENIL AC: 1 (marcação leve); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marcação leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marcações: setas em vermelho.

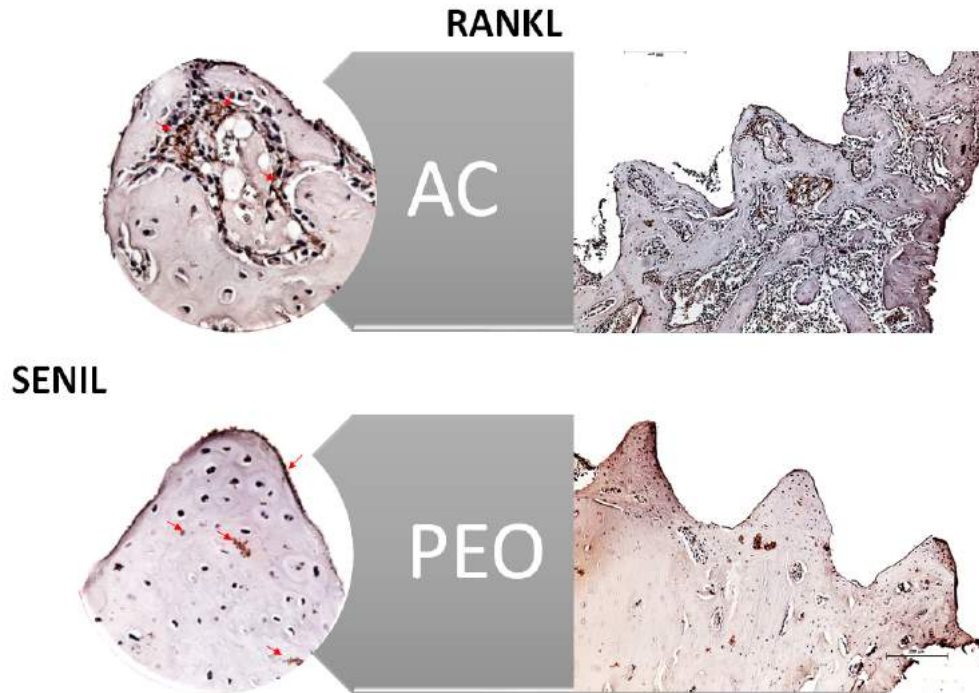


Figura 49 -Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína RANKL. Grupo SENIL AC: 1-2 (marção leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1-2 (marção leve à moderada). Aumentos originais 12x e 40x. *Marções: setas em vermelho.

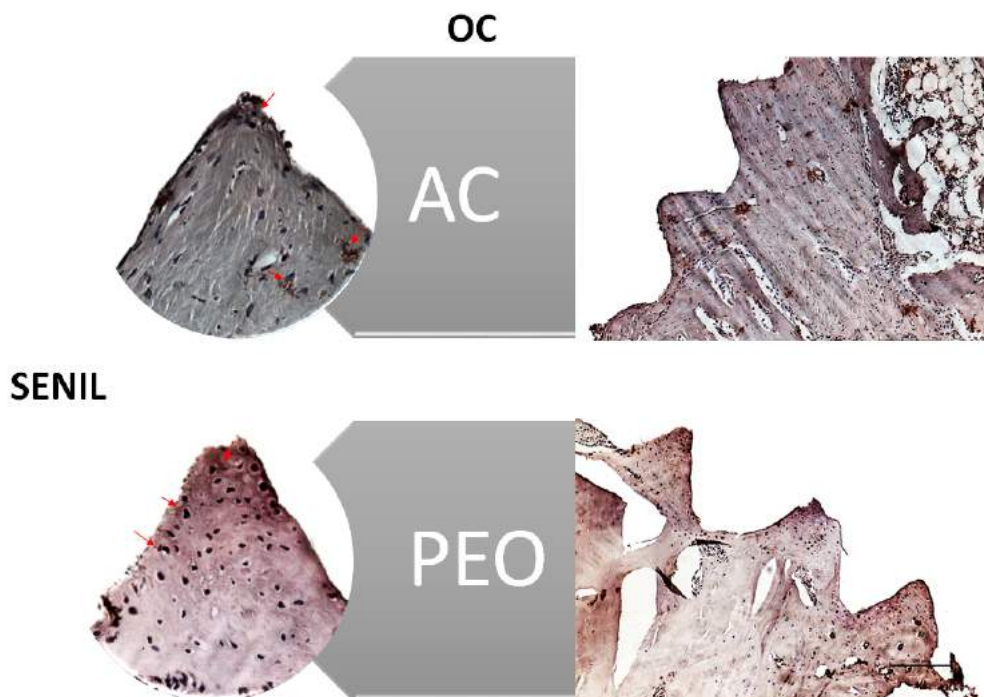


Figura 50- Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcção positiva para proteína Osteocalcina (OC). Grupo SENIL AC: 1 (marção leve); Grupo SENIL PEO: 1 (marção leve). Aumentos originais 12x e 40x. *Marções: setas em vermelho.

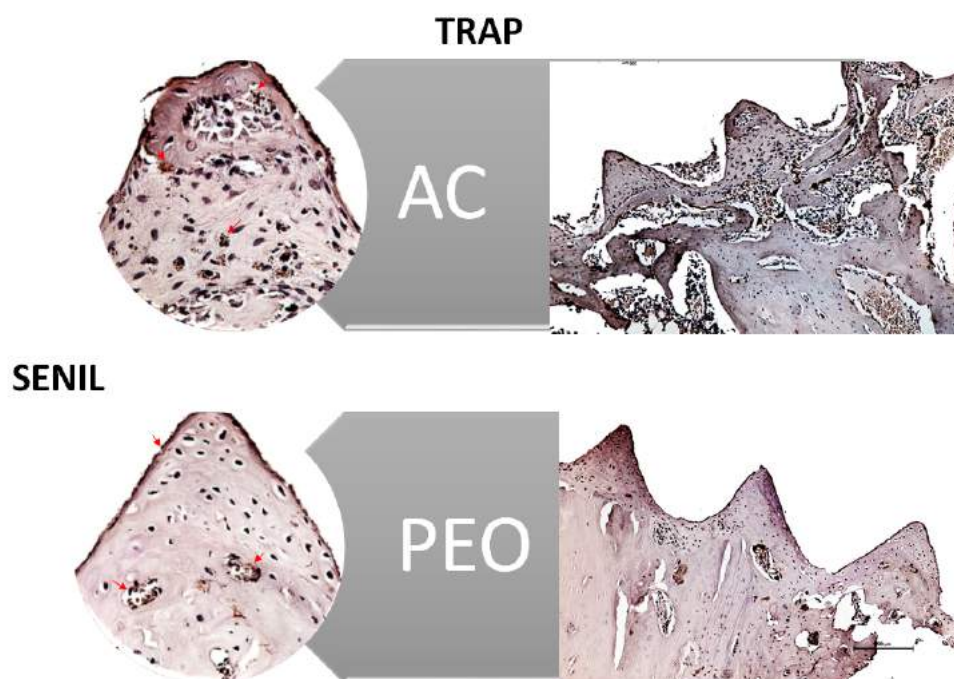


Figura 51 - Fotomicrografias do grupo experimental SENIL em função dos métodos de texturização (PEO e AC) representando a imunomarcagem positiva para proteína TRAP. Grupo SENIL AC: 1-2 (marcação leve à moderada); Grupo SENIL PEO: 1 (marcação leve). Aumentos originais 12x e 40x. *marcações: setas em vermelho.

Os valores representativos do escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Representação dos escores atribuídos na análise imunoistoquímica para as proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP para cada grupo experimental.

Grupos	Proteínas			
	OPG	RANKL	OC	TRAP
SHAM AC	1	1-2	1	1-2
SHAM PEO	1	2	1-2	2
OVX AC	0-1	1	0-1	1-2
OVX PEO	2	0-1	1-2	1-2
SENIL AC	1	1-2	1	1-2
SENIL PEO	1-2	1-2	1	1-2

Para OPG, somente a interação OVX AC vs OVX PEO mostrou significância estatística ($p < 0,05$), com maior marcação para OVX PEO, enquanto que para os demais, houve similaridade das marcações para esta proteína ($p > 0,05$). Para RANKL, o grupo SHAM PEO apresentou maior intensidade de imunomarcação em comparação ao grupo SHAM AC ($p < 0,05$), enquanto que para as demais comparações, houve similaridade das marcações para esta proteína ($p > 0,05$). Para OC, as comparações estatísticas não mostraram significância ($p = 0,0716$), entretanto a imunomarcação para os grupos PEO (SHAM e OVX) foi um pouco mais moderada em relação aos demais grupos, que apresentaram levemente marcadas para a maioria das amostras e até com ausência de marcação para algumas amostras do grupo OVX AC. Para TRAP, todas as comparações foram bem similares entre os grupos ($p = 0,3916$).

Assim, independente das proteínas avaliadas, o comportamento imunoistoquímico das respostas reparacionais no osso de ratas do grupo SENIL foi similar tanto para a superfície AC quanto PEO ($p > 0,05$).

Parâmetros microtomográficos (micro CT)

A representação tridimensional do osso periimplantar escaneado pela microtomografia podem ser visualizadas na Figura 52.

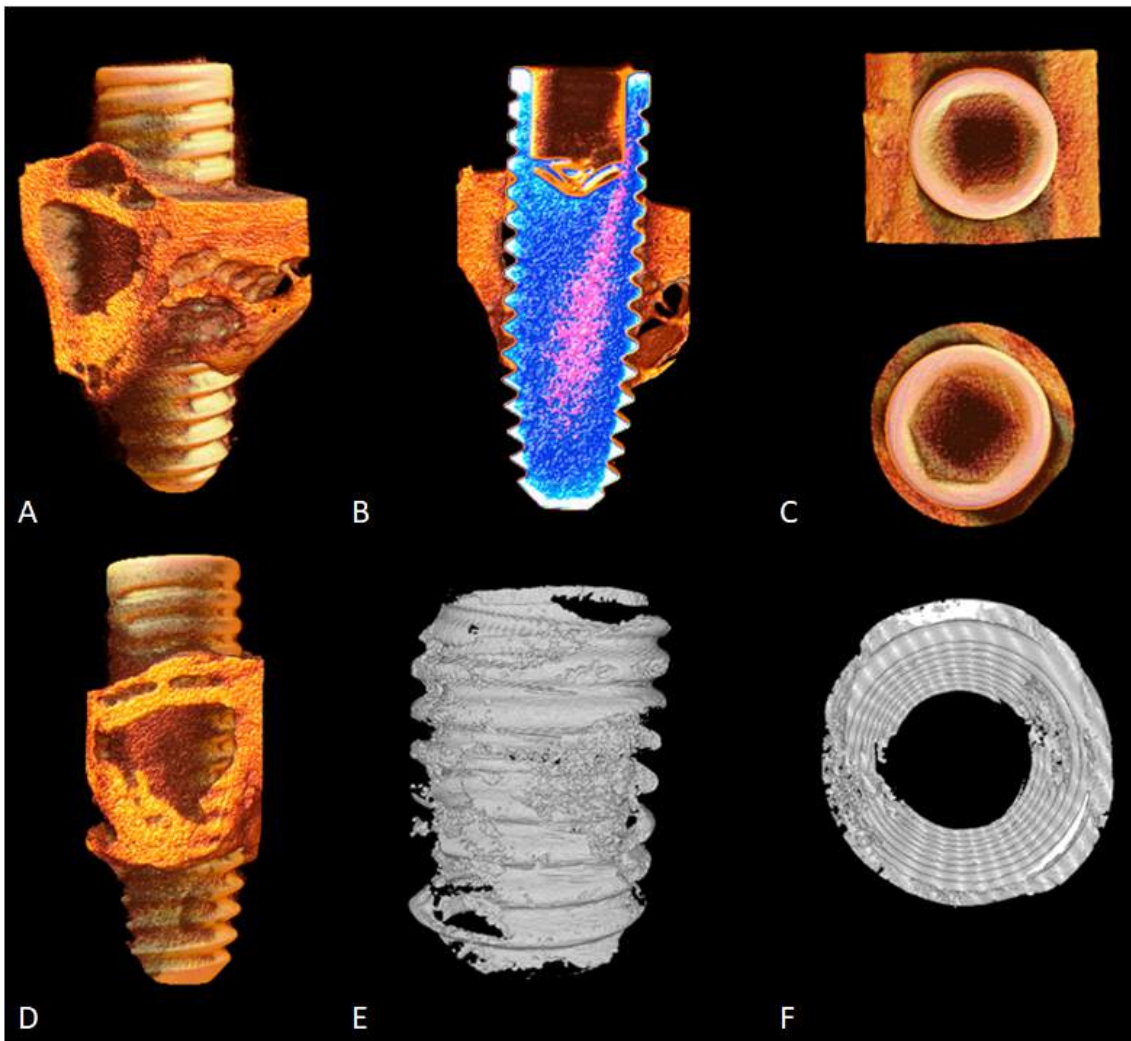


Figura 52 – Imagem representativa da reconstrução obtida pela microtomografia. (A) Reconstrução; (B) Corte medial do implante; (C) Seleção da região de interesse (ROI); (D) Implante com área de osso neoformado após seleção do ROI; (E e F) Área de osso neoformado analisado.

Na análise do parâmetro BV.TV na comparativa dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) não apresentaram significância estatística nos grupos SHAM ($p=0,726$), OVX ($p=0,428$) e SENIL ($p=0,411$) (Figura 53).

A porosidade total – Po (tot), apresentou-se levemente maior nos grupos SHAM PEO, OVX AC e SENIL PEO (Figura 52). A comparação entre AC e PEO não apresentou significância estatística nos grupos SHAM ($p=0,350$), OVX ($p=0,428$) e SENIL ($p=0,408$).

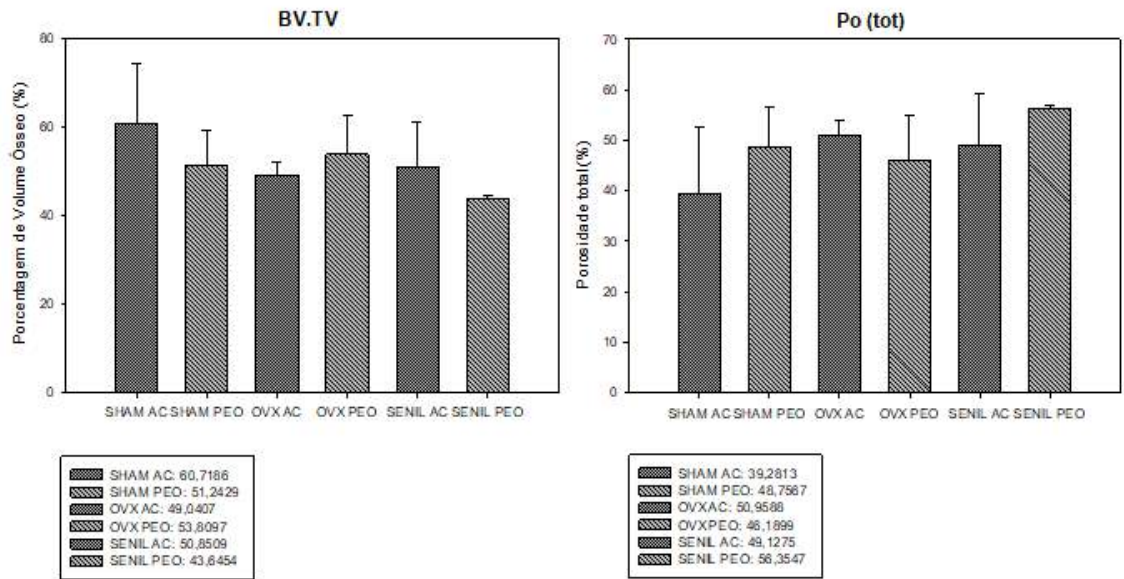


Figura 53 - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos: *Bv.Tv* (porcentagem do volume ósseo) e *Po(tot)* (porcentagem da porosidade total).

Em relação aos parâmetros números de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th) e separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp), houve similaridade entre os tratamentos de superfícies (AC e PEO) ($p > 0,05$) (Figura 54).

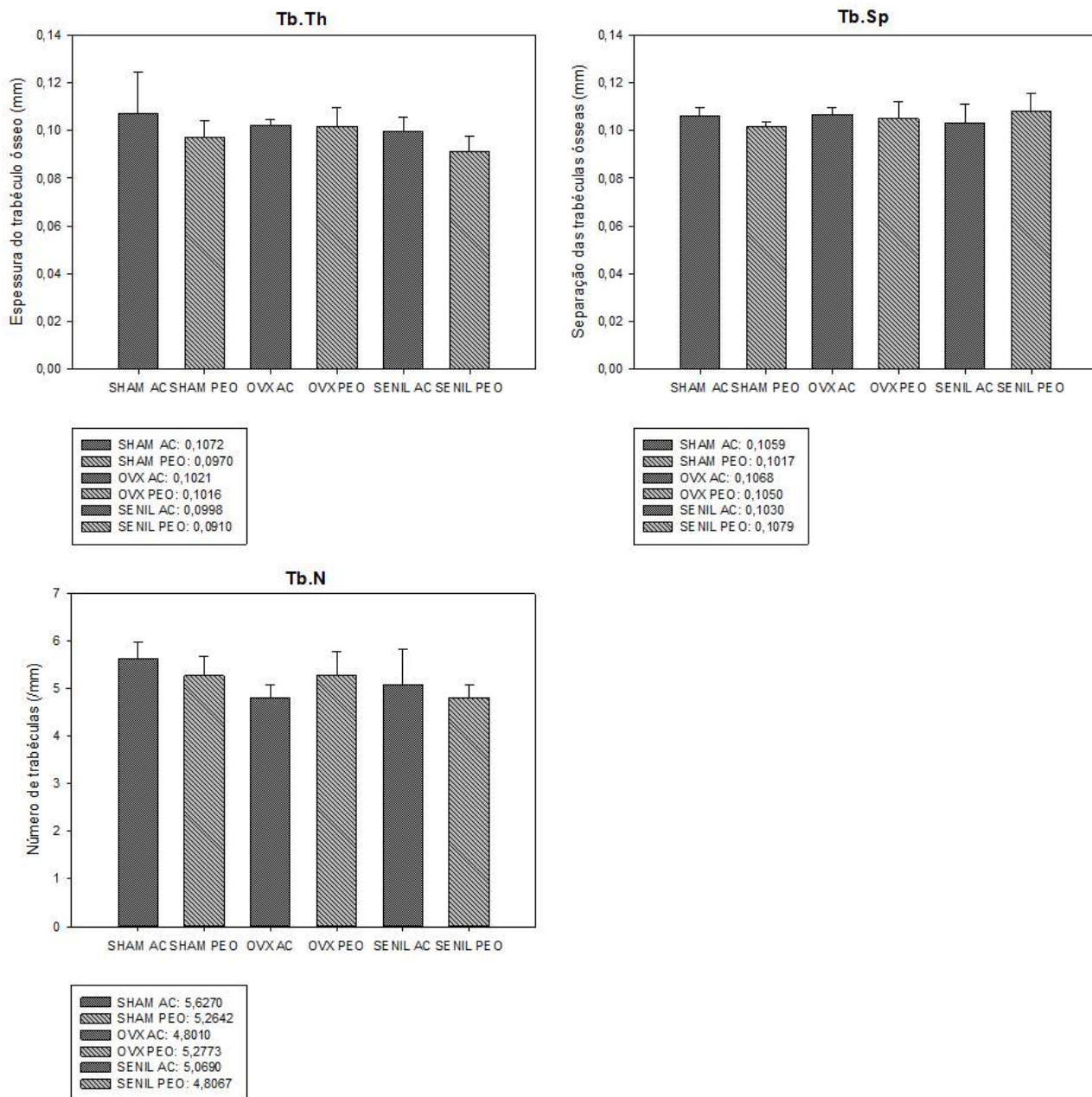


Figura 54 - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos. (a) *Tb.Th*; (b) *Tb.Sp*; (c) *Tb.N*

Grupo SHAM - *Tb.Th* ($p= 0,402$); *Tb.Sp* ($p= 0,161$); *Tb.N* ($p= 0,312$).

Grupo OVX - *Tb.Th* ($p= 0,915$); *Tb.Sp* ($p= 0,703$); *Tb.N* ($p= 0,221$).

Grupo SENIL- *Tb.Th* ($p= 0,222$); *Tb.Sp* ($p= 0,536$) *Tb.N* ($p= 0,677$).

Análise Biomecânica (torque reverso)

Na análise intragrupos (OVX e SHAM), os valores de torque reverso (N.cm) foram maiores para os grupos PEO (SHAM= 7,25+/- 1,7 N.cm; OVX= 5,75+/- 1,7 N.cm) em comparação aos grupos AC (SHAM= 4+/- 0,81 N.cm; OVX= 2+/- 1,4 N.cm) ($p<0,05$). O torque reverso mostrou similaridade estatística nas ratas do grupo SENIL, independentemente do tipo de texturização ($p=0,299$, Mann-Whitney) (Figura 55).

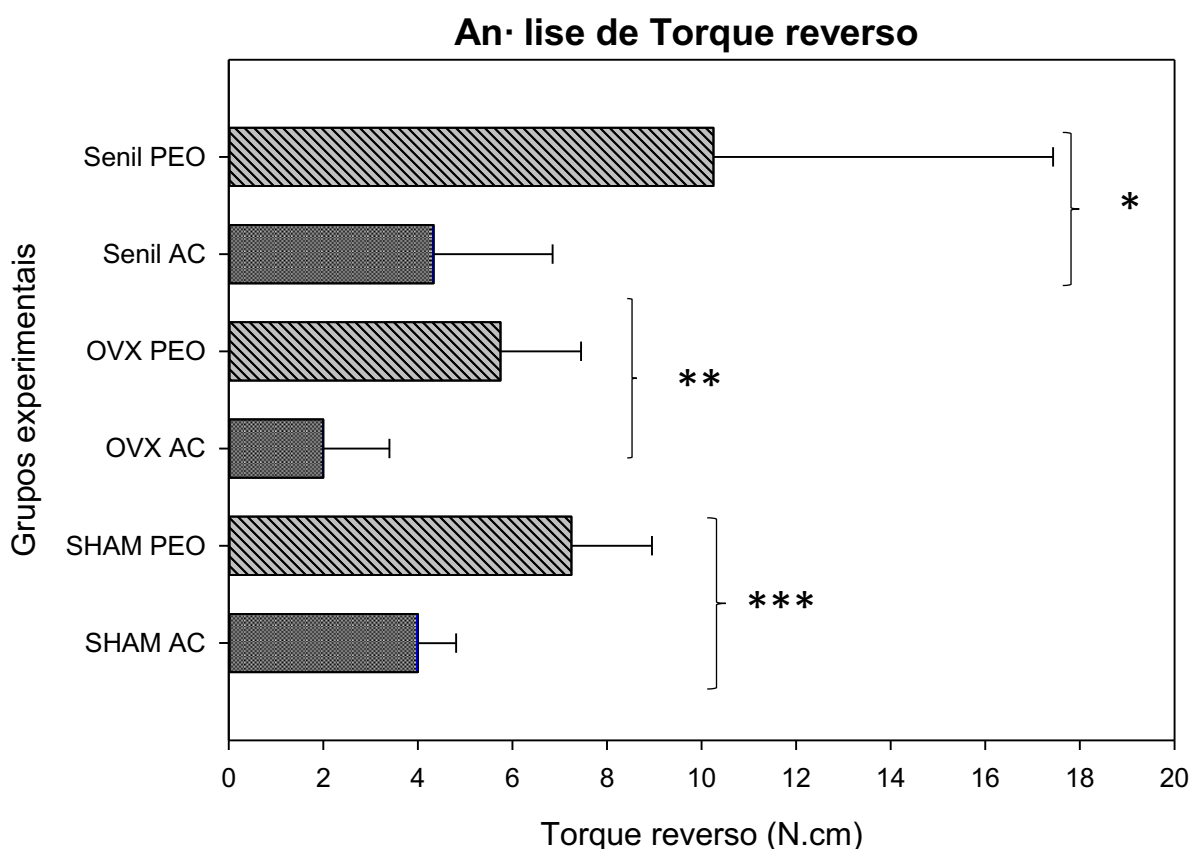


Figura 55 - Análise de Torque reverso: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (N.cm) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

* Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) $p= 0,229$.

** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p<0,05$.

*** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p<0,05$.

Análise molecular do reparo periimplantar (PCR em tempo real)

As respostas celulares do tecido ósseo periimplantar foram comparadas por meio da interação SHAM vs OVX (AC e PEO) e AC vs PEO para ratas senis. A representação gráfica destas comparações podem ser visualizadas na figura 56.

Tanto para OPG, RANKL e OC no grupo OVX, as maiores expressões gênicas relativas foram encontradas no grupo AC ($p < 0,05$). Para o grupo SHAM, os maiores valores foram para o grupo PEO ($p < 0,05$).

Para as ratas senis, a comparação AC vs PEO evidenciou maior expressão gênica de OPG e OC na superfície AC ($p < 0,05$) e, a proteína RANKL se mostrou similar em ambas as superfícies ($p > 0,05$).

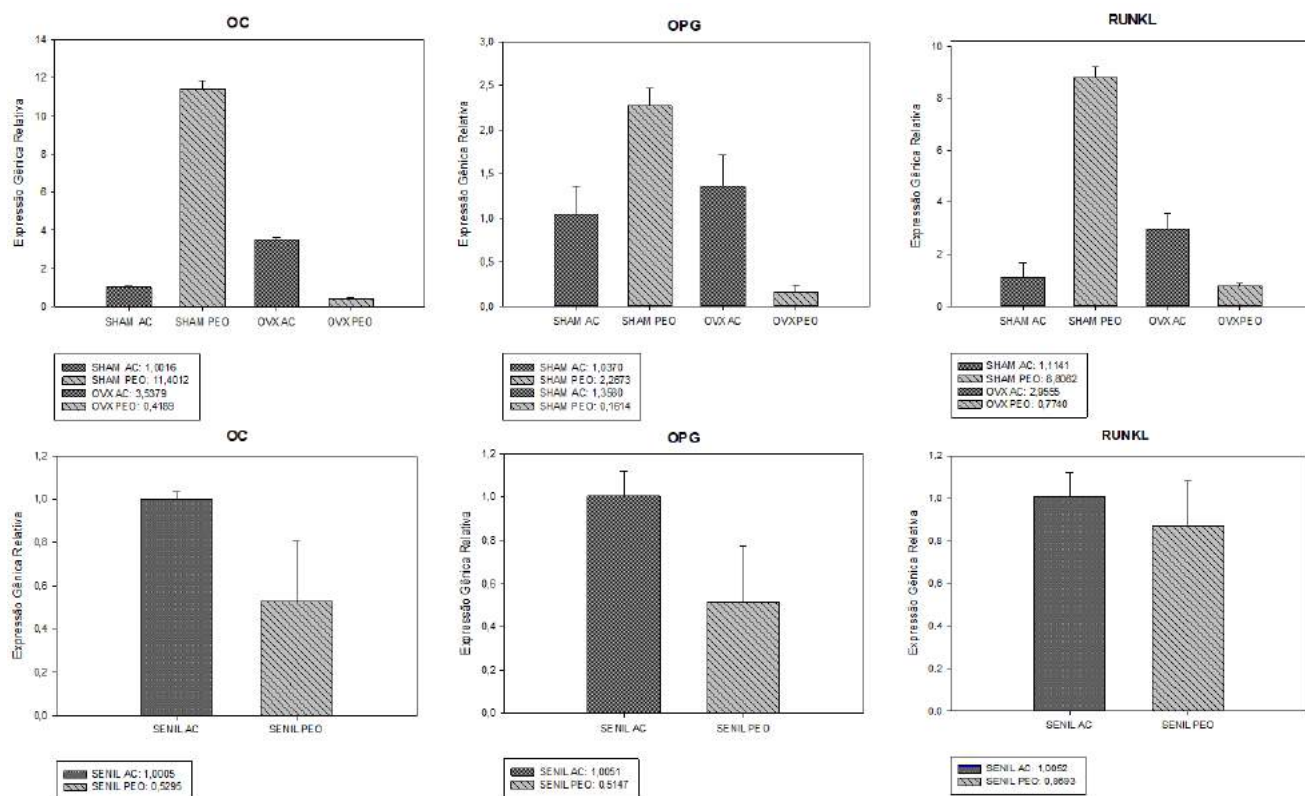


Figura 56 - Análise molecular – PCR em tempo real: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão gênica relativa para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL) em função das proteínas OPG, RANKL e OC.

Microscopia Confocal a laser (dinâmica do osso periimplantar)

A representação das imagens escaneadas em microscopia confocal a laser pode ser visualizada na Figura 57.

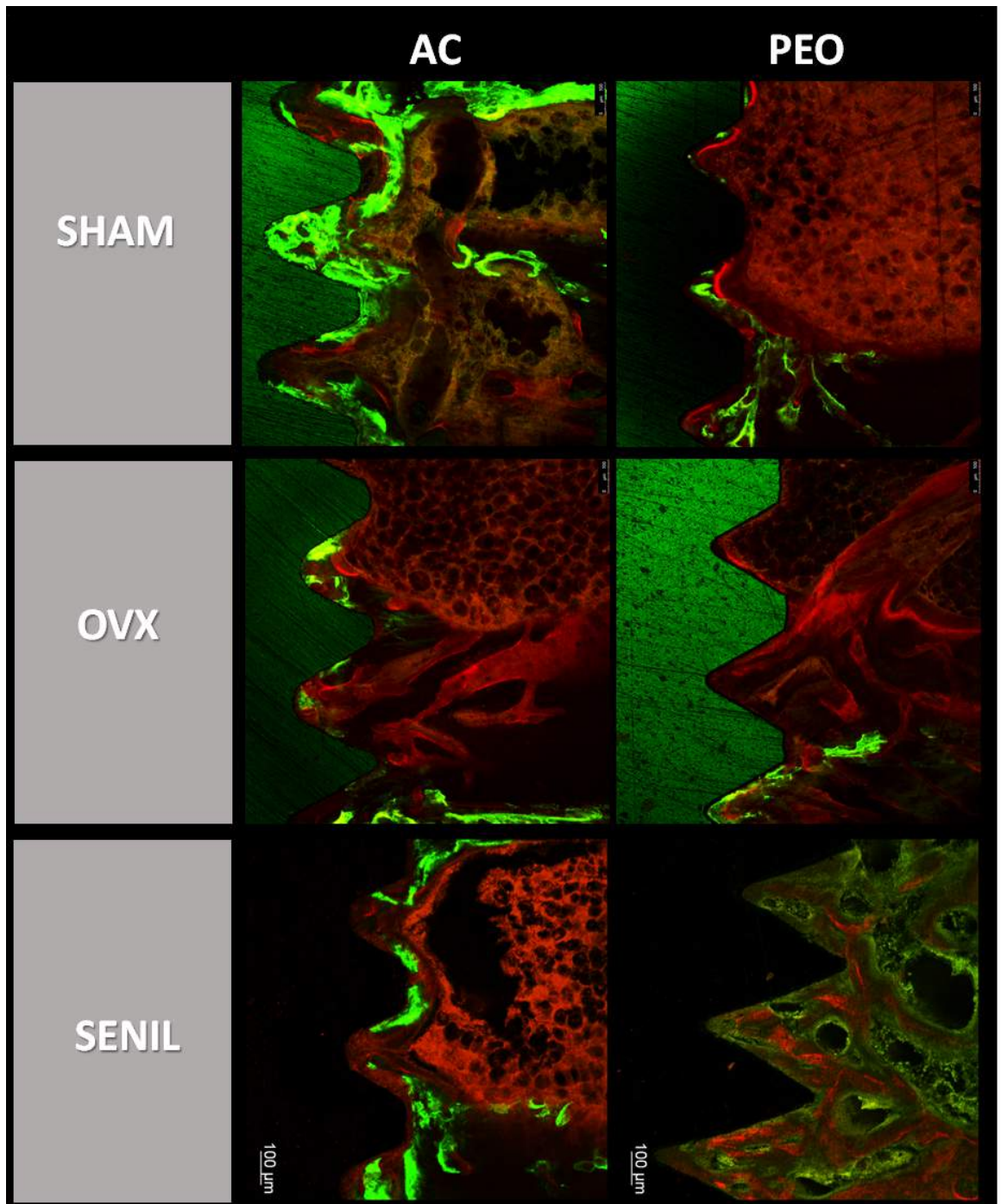


Figura 57 - Imagem da microscopia confocal a laser dos grupos experimentais.

Na análise do dinamismo ósseo periimplantar, a marcação por Calceína foi maior nos grupos SHAM AC, OVX PEO e SENIL AC. Em comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos, não houve significância estatística para SHAM ($p=0,299$), para OVX ($p=0,614$) e para SENIL ($p=0,100$) (Figura 58).

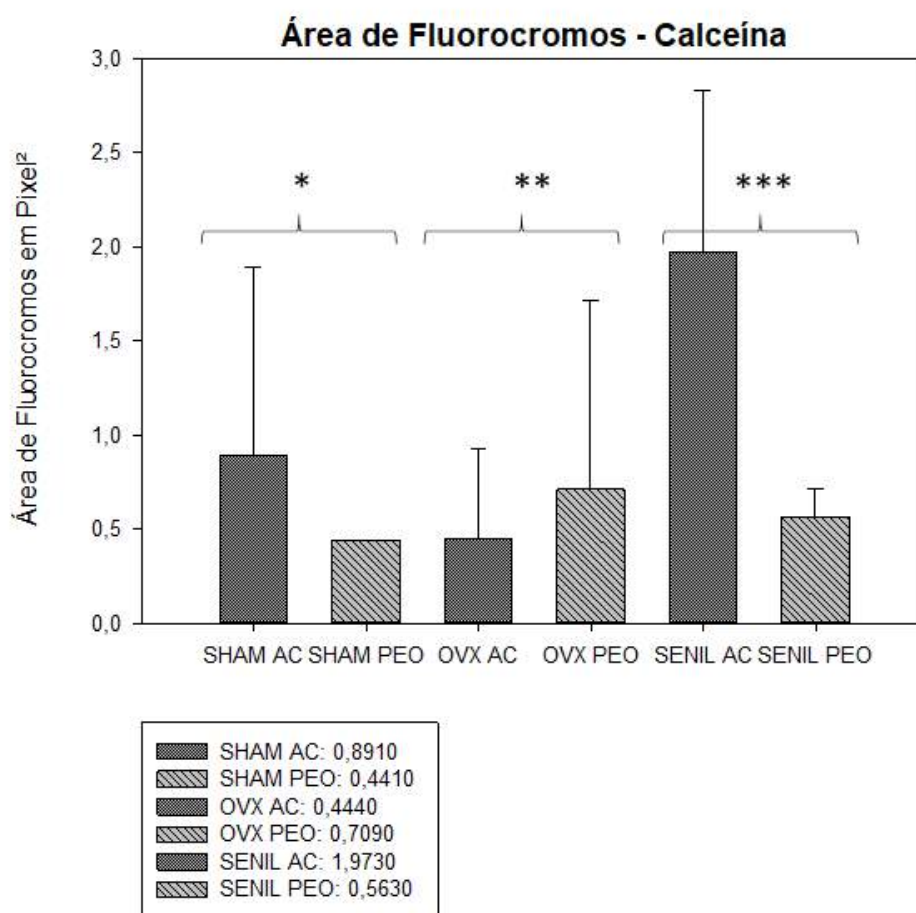


Figura 58 – Área de Fluorocromos - Calceína: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

* Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) $p=0,294$.

** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p=0,614$.

*** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p=0,100$.

A marcação de Alizarina apresentou-se similar nos grupos SHAM e OVX, sendo maior evidenciada no grupo SENIL PEO. Em comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos, não houve significância estatística para SHAM ($p=0,685$), para OVX ($p=0,899$) e para SENIL ($p=0,627$) (Figura 59).

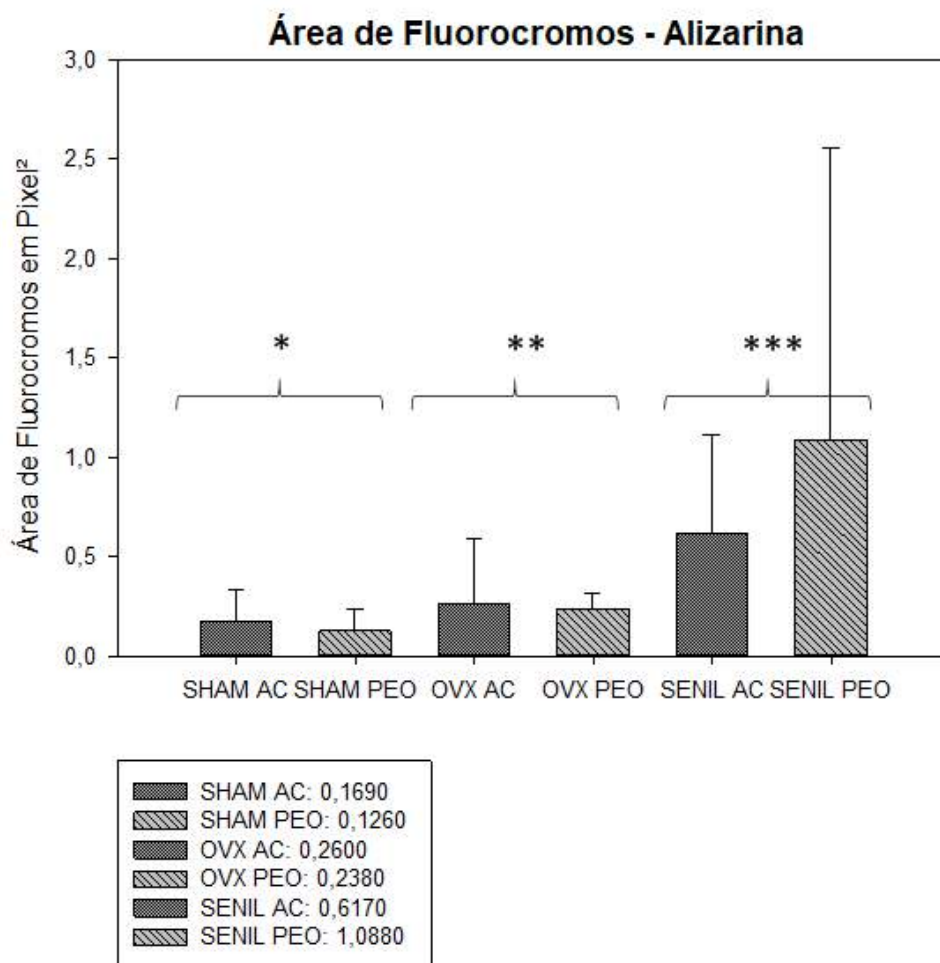


Figura 56 - Área de Fluorocromos - Alizarina: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) para os grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

* Grupo SENIL: comparação dos tratamentos de superfície (AC e PEO) $p=0,685$.

** Grupo OVX: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p=0,899$.

*** Grupo SHAM: comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) $p=0,627$.

A comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais, não foi evidenciada significância estatística para os tratamentos de superfícies (AC e PEO): SHAM ($p=0,242$), OVX ($p=0,624$) e SENIL ($p=0,387$). Porém, a interação dos fluorocromos (Calceína vs alizarina) nos grupos experimentais, houve significância estatística no grupo SHAM ($p=0,026$), com maior precipitação de Calceína. Os grupos OVX ($p=0,203$) e SENIL ($p=0,441$) não apresentaram diferença na significância estatística (Figura 60).

Análise de Fluorocromos -Calceína x Alizarina

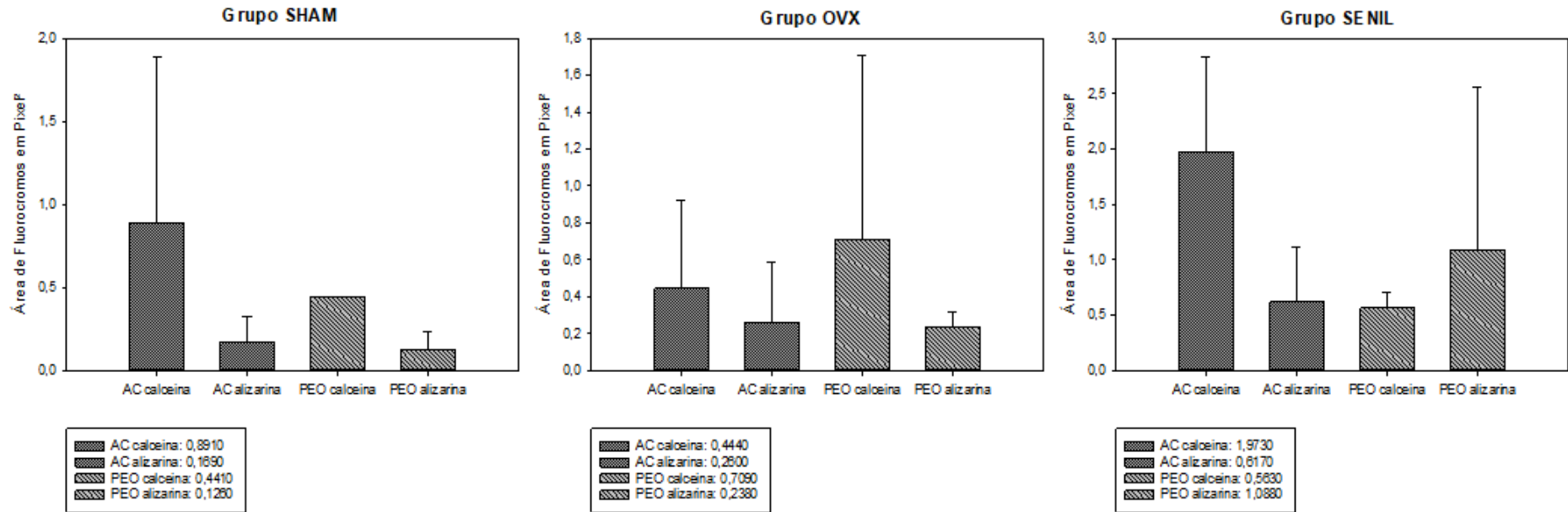


Figura 60 - Análise de Fluorocromos: Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel²) na comparação de Calceína vs Alizarina nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

Em relação a taxa de aposição mineral (MAR) diária, houve uma similaridade dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) nos grupos OVX e SENIL, e uma maior tendência no grupo SHAM PEO em relação ao grupo SHAM AC. Porém não foi evidenciada significância estatística na comparação dos tratamentos de superfícies (AC e PEO) intragrupos SHAM ($p= 0,211$), OVX ($p= 0,795$) e SENIL ($p= 0,771$) (Figura 61).

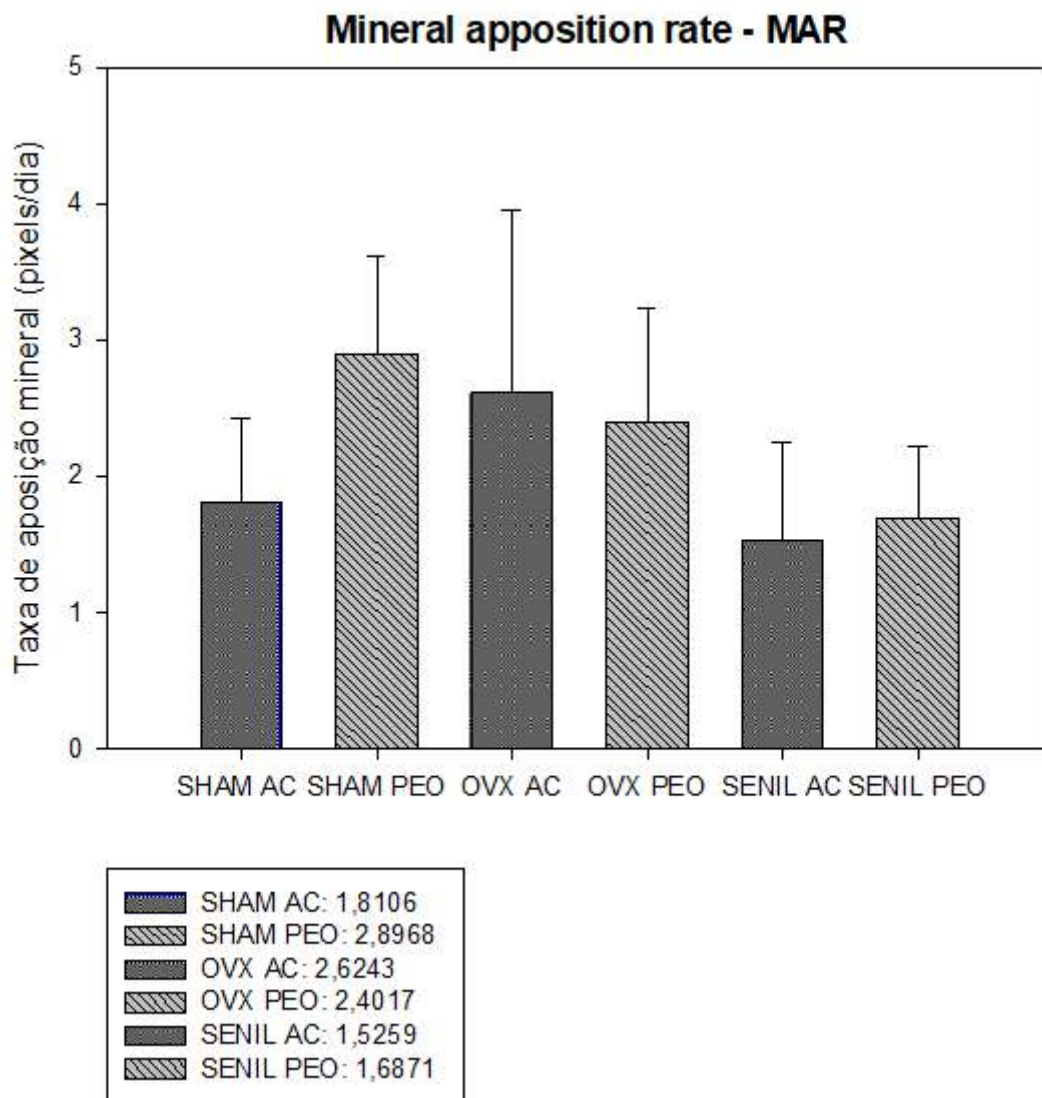


Figura 61 – Taxa de aposição mineral (MAR – mineral apposition rate): Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (pixel/dia) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

Histometria

A representação das imagens obtidas para a histometria pode ser visualizada na Figura 62.

A análise da extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) não mostraram significância estatística (Anova um fator) ao comparar as superfícies AC e PEO, nos grupos SHAM ($p= 0,758$), OVX ($p= 0,374$) e SENIL ($p= 0,258$) (Figura 63 A).

Para a análise da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante, também não apresentou significância estatística (ANOVA um fator) ao comparar o tratamento de superfícies AC e PEO, nos grupos SHAM ($p= 0,682$), OVX ($p= 0,751$) e SENIL ($p= 0,695$) (Figura 63 B).

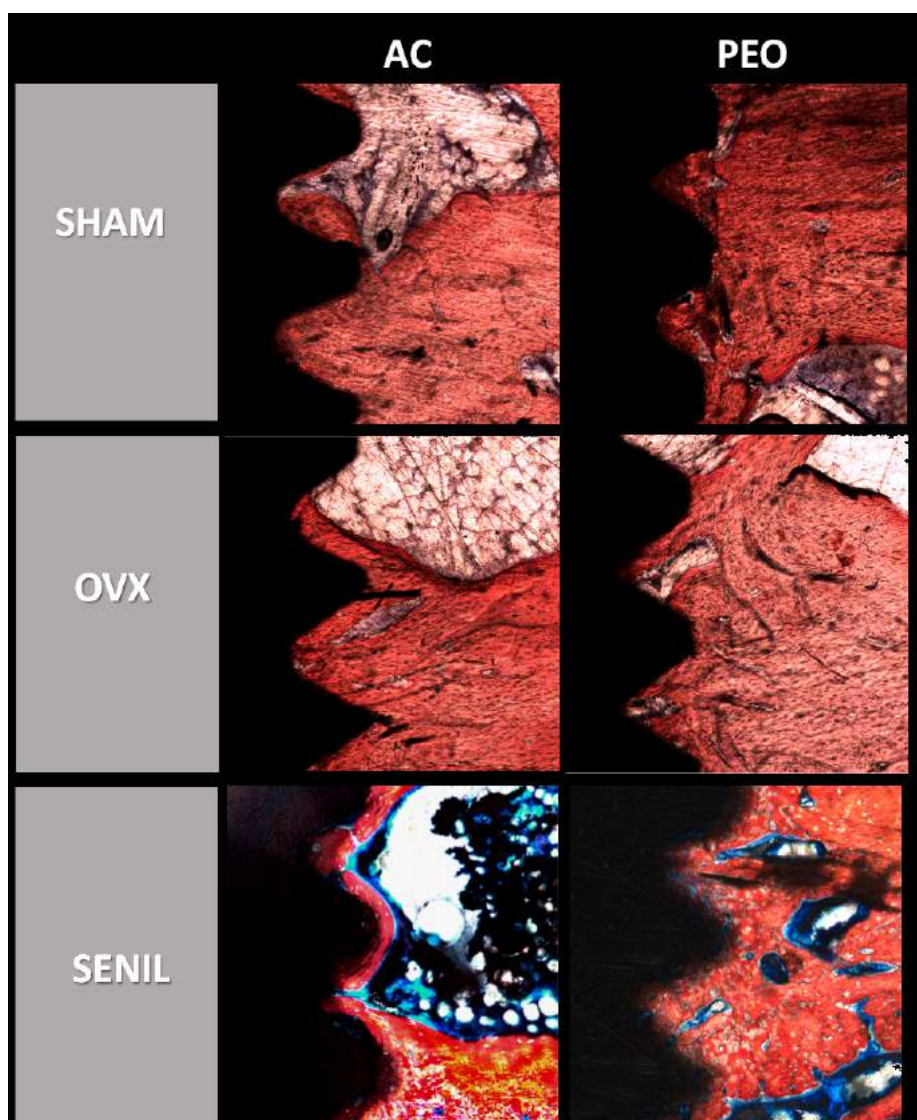


Figura 62 – Imagens dos grupos experimentais para análise histométrica.

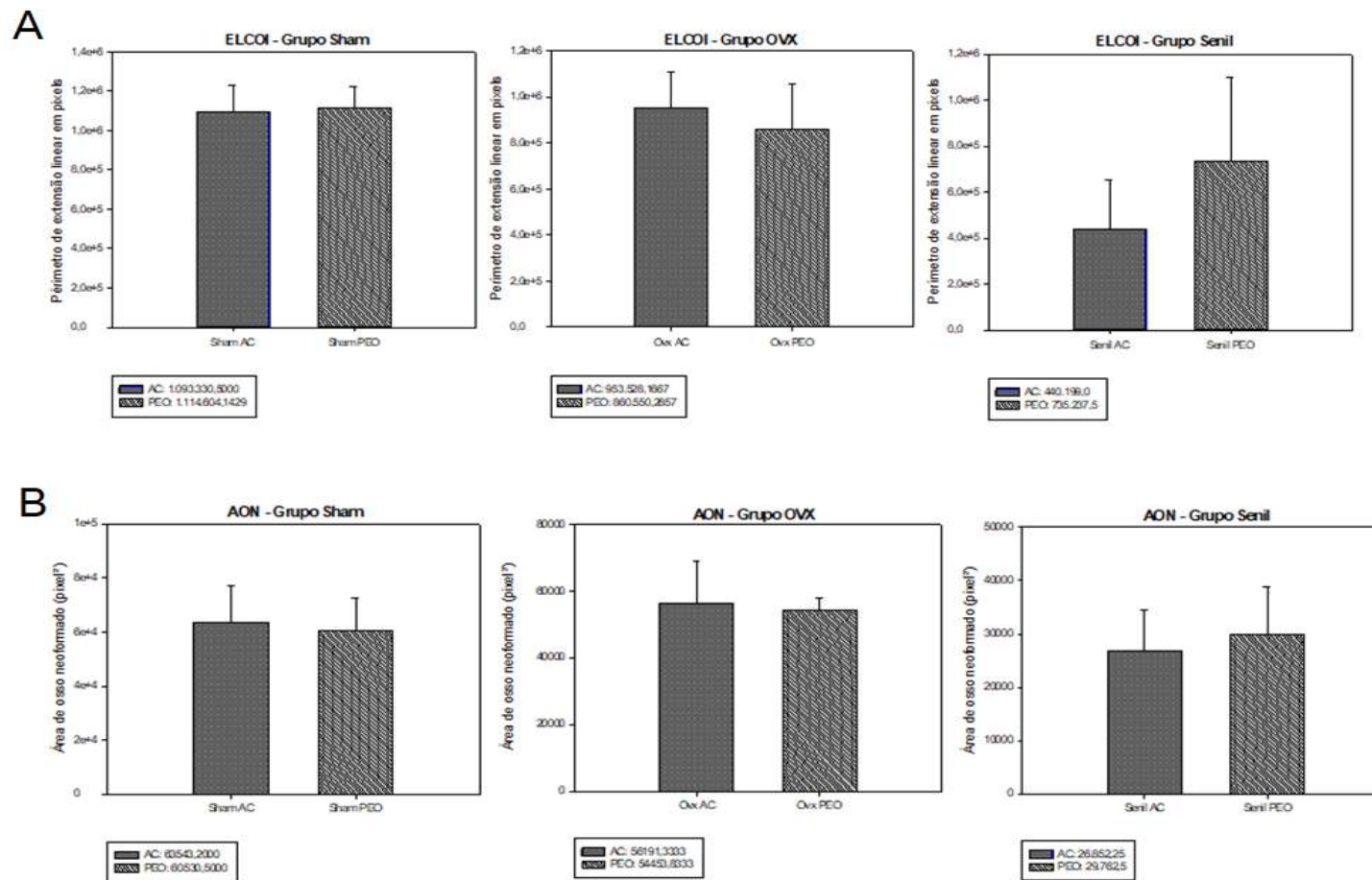


Figura 63 – (A) - Análise da extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL). (B) análise da área de osso neoformado (AON) na espira mais central de cada lado do implante nos grupos experimentais (SHAM, OVX e SENIL).

5. Discussão

A alteração na topografia de superfície dos implantes osseointegráveis tem como objetivo melhorar suas propriedades mecânicas, resistência à corrosão em fluidos biológicos e a as respostas biológicas reparacionais do tecido ósseo. Estudos recentes, demonstram que assim como outros materiais usados em condições fisiológicas, sua exposição a fatores mecânicos e biológicos podem prejudicar a sobrevivência do implante e o sucesso do tratamento [61]. As ligas de titânio, como a liga Ti-6Al-4V vem sendo associadas à liberação de vanádio na corrente sanguínea e urina, e o alumínio mostrou-se presente no tecido cerebral em pacientes com Alzheimer. Esses elementos ocasionam uma iniciação da cascata inflamatória, levando a osteólise, efeitos neurológicos e uma resposta negativa na viabilidade celular [61-64].

Estudos anteriores de caracterização de superfície através do PEO, demonstram que nas superfícies tratadas através do método, produz uma camada de óxido que confere uma maior resistência ao desgaste e à corrosão, produz uma proteção térmica e a possibilidade de uma boa aderência de íons importantes para a osseointegração, como a associação de Ca e P. Essa incorporação de Ca e P mostraram uma estrutura cristalina mais homogênea, além de poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela MEV, além de promover propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos [2, 24, 25, 29].

Marques et al. (2015) relatam uma melhor proliferação de células tronco mesenquimais nos testes de cultura de células em superfícies tratadas por PEO [29]. O teste de viabilidade celular encontrada em nosso estudo mostrou resultados positivos para a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs-MO) nos discos tratados com o PEO. Em todos os grupos testes de CTMs-MO (SHAM, OVX, SENIL) apresentou um crescimento progressivo dentro dos tempos de 3, 7 e 10 dias.

As CTMs provenientes de medula óssea possuem a capacidade de diferenciação em osteoblastos, apesar dos possíveis distúrbios osteogênicos, assim mesmo é melhor do que comparar com outras fontes doadoras, como CTMs de tecido adiposo [48]. A diferenciação das CTMs em osteoblastos foi avaliada através da expressão gênica no 7 dia, através do PCR em tempo real. Os genes avaliados (Runx2, SP7, ALP, BSP, OC e OPN) apresentaram um comportamento diferente nos grupos de CTMs-MO (SHAM, OVX e SENIL), porém a comparação entre os grupos testes de superfícies (CONTROLE, AC e PEO) em cada grupo celular (SHAM, OVX e SENIL) não apresentaram diferenças

estatísticas significantes, mostrando que a superfície do Ti é favorável para a atração de células da linhagem osteoblástica, como já consagrado na literatura.

A expressão de Runx2 e SP7, fatores iniciais essenciais para que ocorra a formação de osteoblastos, foram presentes nos grupos AC e PEO nos grupos SHAM e OVX, não sendo muito expressiva no grupo SENIL. Como marcador da diferenciação de CTMs-MO em Osteoblastos, a ALP foi expressa nos grupos AC e PEO nos grupos SHAM e OVX, tendo uma leve diminuição no grupo SENIL. Os genes BSP, OC e OPN, característicos de uma “etapa final” responsáveis pelo início da mineralização apresentou em uma visão geral dos grupos SHAM, OVX e SENIL, melhores resultados nos grupos AC e PEO. Através dessas análises do PCR e com os dados obtidos pela imunofluorescência, houve uma leve tendência de melhores respostas nas CTMs-MO SHAM para o grupo AC, melhores respostas nas CTMs-MO OVX para o grupo PEO, e no grupo SENIL, características semelhantes dos grupos AC e PEO.

Conforme o processo de diferenciação celular e a mineralização avançam, ocorre um aumento na Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP), assim como encontrado nos resultados realizados no 10º dia, em ambos os grupos celulares pela superfície PEO, seguida pela superfície AC.

As formações de nódulos de mineralização são consideradas como indicadores finais da diferenciação osteogênica “*in vitro*” e sua quantificação demonstra a atividade metabólica das células diferenciadas no processo da osteogênese [65, 66]. Em nosso estudo a superfície PEO apresentou maior formação de nódulos de mineralização aos 21 dias, em todos os grupos celulares (SHAM, OVX e SENIL), resultados similares encontrados na literatura. O estudo de Kazek-Kesik (2015), demonstra que essa atividade de produção de colágeno e mineralização das células, são facilitadas devido as características da superfície promovidas pelo PEO [19, 67].

Os parâmetros obtidos pela histologia na avaliação *in vivo*, demonstrou que houve uma melhor formação e maturação do tecido ósseo na superfície PEO, ao comparar com a superfície AC nos grupos experimentais SHAM e OVX, enquanto no grupo SENIL, houve um comportamento similar na formação e maturação do tecido ósseo nas superfícies (AC e PEO).

Ao complementar com os resultados obtidos pela análise imunoistoquímica, nos demonstram que há um equilíbrio ao comparar todos os grupos e superfícies, referente ao processo de reabsorção óssea avaliado através da TRAP. O dinamismo da remodelação óssea avaliado pela OPG e RANKL, assim como a mineralização (OC) ocorre uma diminuição no grupo OVX, mesmo não sendo estatisticamente significativo, há uma

resposta pouco melhor na superfície PEO ao comparar com superfície AC neste grupo. A remodelação (OPG e RANKL) nos grupos SHAM e SENIL ocorrem com uma similaridade nos tratamentos de superfícies, assim como no processo de mineralização (OC).

No estudo de He *et al.* (2017), a avaliação de implantes de titânio comercialmente puro tratados com PEO ao comparar com implantes sem o tratamento, demonstraram nas análises microtomográficas e histométricas, que os implantes com superfícies modificadas demonstram uma melhor bioatividade em comparação com superfícies de titânio puro, porém os autores relatam que a metodologia aplicada, embora com bons resultados na correlação da microtomografia e histometria, há necessidade de estudos complementares histológicos e de biomecânica [68].

Em nosso estudo, as análises dos tecidos calcificados corroboram com os resultados encontrados na histologia. A quantificação através da porcentagem do volume ósseo (Bv.Tv) e a porosidade total (Po(tot)) não apresentou diferenças estatísticas nos tratamentos de superfícies intragrupos experimentais. Porém, no modelo experimental OVX, a superfície AC apresentou uma menor porcentagem de volume ósseo e maior porosidade ao comparar com a superfície PEO, o que não ocorreu nos outros grupos experimentais (SHAM e SENIL). Em relação a qualidade óssea, característica das trabéculas (Tb.Th/ Tb.Sp /Tb.N) foram semelhantes em todos os grupos.

Assim como na análise microtomográfica, a análise biomecânica através do torque reverso, mostrou maiores torque de remoção dos implantes com a superfície PEO em todos os grupos (SENIL >SHAM >OVX) e menores torques na superfície AC, sendo o grupo OVX o menor (SENIL >SHAM >OVX).

Os tratamentos de superfícies testados nesse estudo demonstram que possuem uma grande capacidade de promoção da formação óssea independente dos tipos ósseos experimentais (SHAM, OVX e SENIL), tanto na área de contato osso e implante (ELCOI), quanto para a área de osso neoformado (AON) entre as espiras do implante.

A incorporação de Ca e P no tratamento de superfície, assim como outros biomateriais como o Zinco (Zn) através do PEO, demonstrou no estudo de He *et al.* (2018) que o tratamento de superfície com Ca, P ou Zn podem acelerar a formação e a remodelação óssea, encurtando o período de osseointegração com melhor força de ligação osso implante [69].

Em nosso estudo, a dinâmica do tecido ósseo representada pelo *turnover* ósseo, observado através dos fluorocromos mostrou-se similares nos grupos experimentais. Uma maior prevalência de fluorescência vermelha (alizarina) representa uma maior é a

formação de osso novo, aparentemente houve uma maior presença de Alizarina no grupo SENIL PEO, porém sem apresentar significância estatística. A interação dos fluorocromos Calceína vs Alizarina apresentou-se estatisticamente significativa no grupo SHAM, sendo representado por maior concentração de Calceína, o qual representa o osso mais velho.

O tratamento de superfície PEO apresentou uma tendência melhor na taxa de aposição mineral (MAR) nos grupos SHAM e SENIL ao comparar com a superfície AC. Para o grupo OVX o tratamento AC demonstrou uma tendência maior que o PEO, porém em ambos os grupos não foi encontrado uma diferença estatística significativa.

Estudos vem demonstrando que o tratamento de superfície pelo método PEO favorece a adição de partículas de Mg, Al, Ti, Ca e P, apresentando melhoria na proteção quanto à corrosão e ao desgaste, sendo que a resposta celular inicial é maior com o Ca e P, em relação aos demais, devido uma maior efetividade para a biocompatibilidade e bioatividade [70]. Segundo Zaporozhets (2017), a incorporação desses elementos possui uma capacidade de controlar melhor a resposta inflamatória local pela modificação do processo de ativação leucocitária do sangue, mais evidente nos neutrófilos em contato com a superfície da liga de Ti [71].

Os íons Zn exercem numerosos efeitos positivos sobre o metabolismo dos ácidos nucléicos, síntese proteica e formação óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de fornecer propriedades mecânicas superiores e melhor propriedade de corrosão de materiais, incorporação de íons de Zn juntamente com Ca e P no tratamento por PEO, ainda em estudo *in vitro* demonstra alterações no potencial de corrosão e alterações em tamanho dos poros, à medida que a concentração de Zn aumenta, diminui a concentração de Ca e P [18].

A eleição dos grupos experimentais SHAM, OVX e SENIL, nos demonstrou que para a avaliação do biomaterial testado (AC ou PEO), o modelo osteoporótico promovido pelo grupo OVX, apresenta-se como um melhor modelo. Os dados obtidos pelo método ELISA, na avaliação de estrógeno demonstraram que para as ratas SENIS, há uma diminuição em relação as ratas SHAM, porém em níveis bem superiores as ratas OVX, os quais repercutiram nos processos reparacionais. O modelo OVX foi caracterizado pela perda de massa óssea, com maior atividade osteoclastogênica em relação a osteoblastogênese, com resultados reparacionais mais críticos, o que permite melhor avaliação dos biomateriais e modificações topográficas como propostas neste estudo.

É importante salientar que o estudo da bioatividade de implantes no tecido ósseo de baixa qualidade, como realizado nesta investigação, não está relacionado ao tratamento da osteoporose, por meio de medicações que revertam a osteoporose, tais como os antirreabsortivos e os seletivos dos receptores de estrógeno. Estudos prévios [72, 73], demonstraram que o tratamento sistêmico, auxiliou nas respostas moleculares da biologia do tecido ósseo. Desta forma, o PEO demonstrou que mesmo em situações bastante críticas do metabolismo ósseo (OVX), foi capaz de reunir características reparacionais favoráveis à osseointegração.

6. Conclusão

Diante das limitações do estudo *in vitro e in vivo*, os resultados foram esclarecedores para acreditar que o método de texturização aqui testado, por meio da Oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO), favoreceu à formação óssea, tanto em ossos de baixa densidade (OVX e SENIL) quanto em ossos considerados como “normais” (SHAM), inclusive evidenciando maior maturação óssea nos períodos mais tardios aqui analisados.

7. Referências

- [1] T. Albrektsson, A. Wennerberg, Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them, *Int J Prosthodont* 17(5) (2004) 536-543.
- [2] L.P. Faverani, V.A. Barao, M.F. Pires, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, W.G. Assuncao, Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 43 (2014) 1-10.
- [3] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, *Journal of dental research* 83(7) (2004) 529-33.
- [4] C.J. Ivanoff, C. Hallgren, G. Widmark, L. Sennerby, A. Wennerberg, Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans, *Clinical oral implants research* 12(2) (2001) 128-34.
- [5] M.G. Tavares, P.T. de Oliveira, A. Nanci, A.C. Hawthorne, A.L. Rosa, S.P. Xavier, Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H2SO4/H2O2 enhances contact osteogenesis, *Clinical oral implants research* 18(4) (2007) 452-8.
- [6] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clinical oral implants research* 20 Suppl 4 (2009) 172-84.
- [7] S.P. Xavier, P.S. Carvalho, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments, *Journal of dentistry* 31(3) (2003) 173-80.
- [8] A. Lin, C.J. Wang, J. Kelly, P. Gubbi, I. Nishimura, The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant

- fixation in vivo, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 24(5) (2009) 808-16.
- [9] A. Gupta, M. Dhanraj, G. Sivagami, Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview, *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 21(3) (2010) 433-8.
- [10] P. Trisi, R. Lazzara, A. Rebaudi, W. Rao, T. Testori, S.S. Porter, Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla, *Journal of periodontology* 74(7) (2003) 945-56.
- [11] N.T. Oliveira, F.P. Guastaldi, V. Perrotti, E. Hochuli-Vieira, A.C. Guastaldi, A. Piattelli, G. Iezzi, Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits, *Clinical implant dentistry and related research* 15(3) (2013) 427-37.
- [12] T.P. Queiroz, F.A. Souza, A.C. Guastaldi, R. Margonar, I.R. Garcia, E. Hochuli-Vieira, Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits, *Clinical oral implants research* 24(8) (2013) 896-903.
- [13] W. Zechner, S. Tangl, G. Furst, G. Tepper, U. Thams, G. Mailath, G. Watzek, Osseous healing characteristics of three different implant types - A histologic and histomorphometric study in mini-pigs, *Clinical oral implants research* 14(2) (2003) 150-157.
- [14] F.A. Souza, T.P. Queiroz, A.C. Guastaldi, R. Garcia, O. Magro, R.S. Nishioka, K.E. Sisti, C.K. Sonoda, Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis, *J Biomed Mater Res B* 101B(1) (2013) 76-84.
- [15] R.L.W. Messer, G. Tackas, J. Mickalonis, Y. Brown, J.B. Lewis, J.C. Wataha, Corrosion of Machined Titanium Dental Implants Under Inflammatory Conditions, *J Biomed Mater Res B* 88B(2) (2009) 474-481.
- [16] L.P. Faverani, W.G. Assuncao, P.S. de Carvalho, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A. Barao, Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching, *PloS one* 9(3) (2014) e93377.
- [17] V.A. Barao, A.P. Ricomini-Filho, L.P. Faverani, A.A. Del Bel Cury, C. Sukotjo, D.R. Monteiro, J.C. Yuan, M.T. Mathew, R.C. do Amaral, M.F. Mesquita, W.J. da Silva, W.G. Assuncao, The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 56 (2015) 114-24.
- [18] I.-J. Hwang, H.-C. Choe, W.A. Brantley, Electrochemical characteristics of Ti-6Al-4V after plasma electrolytic oxidation in solutions containing Ca, P, and Zn ions, *Surface and Coatings Technology* 320 (2017) 458-466.
- [19] A. Krzakała, K. Służalska, M. Widziółek, J. Szade, A. Winiarski, G. Dercz, A. Kazek, G. Tylko, J. Michalska, A. Iwaniak, A.M. Osyczka, W. Simka, Formation of bioactive coatings on a Ti-6Al-7Nb alloy by plasma electrolytic oxidation, *Electrochimica Acta* 104 (2013) 407-424.
- [20] S. Lederer, P. Lutz, W. Fürbeth, Surface modification of Ti 13Nb 13Zr by plasma electrolytic oxidation, *Surface and Coatings Technology* 335 (2018) 62-71.
- [21] C. Ferreira Ribeiro, K. Cogo-Muller, G.C. Franco, L.R. Silva-Concilio, M. Sampaio Campos, S. de Mello Rode, A.C. Claro Neves, Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study, *Archives of oral biology* 69 (2016) 33-39.
- [22] M.W.D. Mendes, C.G. Agreda, A.H.A. Bressiani, J.C. Bressiani, A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial, *Mat Sci Eng C-Mater* 63 (2016) 671-677.

- [23] W. Luo, J. Zhao, X. Meng, S. Ma, Q. Sun, T. Guo, Y. Wang, Y. Zhou, [Effect of Zinc Doped Calcium Phosphate Coating on Bone Formation and the Underlying Biological Mechanism], *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* 32(6) (2015) 1359-63.
- [24] A.K.-K. A. Krzakala, and W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv* 3 (2013) 19725.
- [25] C.A. Laurindo, R.D. Torres, S.A. Mali, J.L. Gilbert, P. Soares, Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 37 (2014) 223-31.
- [26] X.N. A. L. Yerokhin, A. Leyland, A. Matthews, and S. J. Dowey, Plasma electrolysis for surface engineering, *Surface and Coatings Technology* 122(2-3) (1999) 73-93.
- [27] C.T.J.L. F. C. Walsh, R. J. K. Wood, K. T. Stevens, J. Archer, A. R. Poeton, and A. Ryder, Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys, *Transactions of the IMF: The International Journal of Surface Engineering and Coatings* 87(3) (2009) 122-35.
- [28] T. Akatsu, Y. Yamada, Y. Hoshikawa, T. Onoki, Y. Shinoda, F. Wakai, Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 33(8) (2013) 4871-5.
- [29] d.C.N. Marques Ida S, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VA., Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration, *Biointerphases* 10(4) (2015) 041002.
- [30] I.D. Marques, V.A. Barao, N.C. da Cruz, J.C. Yuan, M.F. Mesquita, A.P. Ricomini-Filho, C. Sukotjo, M.T. Mathew, Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application, 100 (2015) 133-146.
- [31] U.H. Lerner, Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *Journal of dental research* 85(7) (2006) 584-95.
- [32] U.H. Lerner, Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis, *Journal of dental research* 85(7) (2006) 596-607.
- [33] D. Hurst, Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure, *Evidence-based dentistry* 15(4) (2014) 102-3.
- [34] J. He, B. Zhao, C. Deng, D. Shang, C. Zhang, Assessment of implant cumulative survival rates in sites with different bone density and related prognostic factors: an 8-year retrospective study of 2,684 implants, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 30(2) (2015) 360-71.
- [35] B.R. Chrcanovic, T. Albrektsson, A. Wennerberg, Diabetes and oral implant failure: a systematic review, *Journal of dental research* 93(9) (2014) 859-67.
- [36] D. LeRoith, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Foreword*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 41(4) (2012) xi-xiii.
- [37] R. Rapaport, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Pediatric endocrinology. Preface*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 41(4) (2012) xv-xvi.
- [38] D. LeRoith, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Neuroendocrine control of metabolism. Foreword*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 42(1) (2013) xi-xiii.
- [39] E.A. Aguilar, S.D. Barry, C.A. Cefalu, A. Abdo, W.P. Hudson, J.S. Campbell, T.M. Reske, M. Bonafede, K. Wilson, B.S. Stolshek, C.J. Paoli, N. Tran, L.I. Cheng,

Osteoporosis Diagnosis and Management in Long-Term Care Facility, *The American journal of the medical sciences* 350(5) (2015) 357-63.

[40] H. Lehnert, [Underestimated osteoporosis: New directions in diagnosis and therapy], *Deutsche medizinische Wochenschrift* 140(22) (2015) 1660.

[41] B. Zhou, Y. Lu, K. Hajifathalian, J. Bentham, M. Di Cesare, G. Danaei, H. Bixby, M.J. Cowan, M.K. Ali, C. Taddei, W.C. Lo, B. Reis-Santos, G.A. Stevens, L.M. Riley, J.J. Miranda, P. Bjerregaard, J.A. Rivera, H.M. Fouad, G.S. Ma, J.C.N. Mbanya, S.T. McGarvey, V. Mohan, A. Onat, A. Ramachandran, H. Ben Romdhane, C.J. Paciorek, J.E. Bennett, M. Ezzati, Z.A. Abdeen, K.A. Kadir, N.M. Abu-Rmeileh, B. Acosta-Cazares, R. Adams, W. Aekplakorn, C.A. Aguilar-Salinas, C. Agyemang, A. Ahmadvand, A.R. Al-Othman, A. Alkerwi, P. Amouyel, A. Amuzu, L.B. Andersen, S.A. Anderssen, R.M. Anjana, H. Aounallah-Skhiri, T. Aris, N. Arlappa, D. Arveiler, F.K. Assah, M. Avdicova, F. Azizi, N. Balakrishna, P. Bandosz, C.M. Barbagallo, A. Barcelo, A.M. Batieha, L.A. Baur, H. Ben Romdhane, M. Benet, A. Bernabe-Ortiz, S. Bharadwaj, S.K. Bhargava, Y.F. Bi, P. Bjerregaard, E. Bjertness, M.B. Bjertness, C. Bjokelund, A. Blokstra, S. Bo, B.O. Boehm, C.P. Boissonnet, P. Bovet, I. Brajkovich, J. Breckenkamp, H. Brenner, L.M. Brewster, G.R. Brian, G. Bruno, A. Bugge, A.C. de Leon, G. Can, A.P.C. Candido, V. Capuano, A.C. Carlsson, M.J. Carvalho, F.F. Casanueva, J.P. Casas, C.A. Caserta, K. Castetbon, S. Chamukuttan, N. Chaturvedi, C.J. Chen, F.F. Chen, S.H. Chen, C.Y. Cheng, A. Chetrit, S.T. Chiou, Y. Cho, J. Chudek, R. Cifkova, F. Claessens, H. Concin, C. Cooper, R. Cooper, S. Costanzo, D. Cottel, C. Cowell, A.B. Crujeiras, G. D'Arrigo, J. Dallongeville, R. Dankner, L. Dauchet, G. de Gaetano, S. De Henauw, M. Deepa, A. Dehghan, V. Deschamps, K. Dhana, A.F. Di Castelnuovo, S. Djalalinia, K. Doua, W. Drygas, Y. Du, V. Dzerve, E.E. Egbagbe, R. Eggertsen, J. El Ati, R. Elosua, R.T. Erasmus, C. Erem, G. Ergor, L. Eriksen, J. Escobedo-de la Pena, C.H. Fall, F. Farzadfar, F.J. Felix-Redondo, T.S. Ferguson, D. Fernandez-Berges, M. Ferrari, C. Ferreccio, E.J.M. Feskens, J.D. Finn, B. Foger, L.H. Foo, A.S. Forslund, H.M. Fouad, D.K. Francis, M.D. Franco, O.H. Franco, G. Frontera, T. Furusawa, Z. Gaciong, S.P. Garnett, J.M. Gaspoz, M. Gasull, L. Gates, J.M. Geleijnse, A. Ghasemian, A. Ghimire, S. Giampaoli, F. Gianfagna, J. Giovannelli, A. Giwerzman, M.G. Gross, J.P.G. Rivas, M.B. Gorbea, F. Gottrand, D. Grafnetter, T. Grodzicki, A. Grontved, G. Gruden, D.F. Gu, O.P. Guan, R. Guerrero, I. Guessous, A.L. Guimaraes, L. Gutierrez, I.R. Hambleton, R. Hardy, R.H. Kumar, J. Hata, C. Heidemann, S. Herrala, I.T. Hihtaniemi, S.Y. Ho, S.C. Ho, A. Hofman, C.M. Hormiga, B.L. Horta, L. Houti, C. Howitt, T.T. Htay, A.S. Htet, M.M.T. Htike, M.M.T. Htike, Y. Hu, A.S. Hussieni, I. Huybrechts, N. Hwalla, L. Iacoviello, A.G. Iannone, M.M. Ibrahim, N. Ikeda, M.A. Ikram, V.E. Irazola, M. Islam, M. Iwasaki, J.M. Jacobs, T. Jafar, K.M. Jamil, G. Jasienska, C.Q. Jiang, J.B. Jonas, P. Joshi, A. Kafatos, O. Kalter-Leibovici, A. Kasaeian, J. Katz, P. Kaur, M. Kavousi, R. Kelishadi, A.P. Kengne, M. Kersting, Y.S. Khader, D. Khalili, Y.H. Khang, S. Kiechl, J. Kim, P. Kolsteren, W. Kratzer, D. Kromhout, U.M. Kujala, K. Kula, C. Kyobutungi, T. Laatikainen, C. Lachat, Y. Laid, T.H. Lam, O. Landrove, V. Lanska, G. Lappas, A. Laxmaiah, C. Leclercq, J. Lee, J. Lee, T. Lehtimaki, R. Lekhraj, L.M. Leon-Munoz, Y.P. Li, W.Y. Lim, M.F. Lima-Costa, H.H. Lin, X. Lin, L. Lissner, R. Lorbeer, J.E. Lozano, D. Luksiene, A. Lundqvist, P. Lytsy, G.S. Ma, G.L.L. Machado-Coelho, S. Machi, S. Maggi, D.J. Magliano, M. Makdisse, K.M. Rao, Y. Manios, E. Manzato, P. Margozzini, P. Marques-Vidal, R. Martorell, S.R. Masoodi, E.B. Mathiesen, T.E. Matsha, J.C.N. Mbanya, S.R. McFarlane, S.T. McGarvey, S. McLachlan, B.A. McNulty, S. Mediene-Benchekor, A. Meirhaeghe, A.M.B. Menezes, S. Merat, I.I. Meshram, J. Mi, J.F. Miquel, J.J. Miranda, M.K. Mohamed, K. Mohammad, N. Mohammadifard, V. Mohan, M.F.M. Yusoff, N.C. Moller, D. Molnar, C.K. Mondo, A. Morejon, L.A. Moreno, K. Morgan, G. Moschonis, M. Mossakowska, A. Mostafa, J. Mota, J. Motta, T.T. Mu, M.L. Muiesan, M. Muller-Nurasyid, J. Mursu, G. Nagel, J. Namesna, E.E.K. Nang, V.B. Nangia, E.M.

Navarrete-Munoz, N.C. Ndiaye, I. Nenko, F. Nervi, N.D. Nguyen, Q.N. Nguyen, R.S.E. Nieto-Martinez, G. Ning, T. Ninomiya, M. Noale, D. Noto, M. Al Nsour, A.M. Ochoa-Aviles, K. Oh, A. Onat, P. Ordunez, C. Osmond, J.A. Otero, E. Owusu-Dabo, E. Pahomova, L. Palmieri, S. Panda-Jonas, F. Panza, M. Parsaeian, S.V. Peixoto, M. Peltonen, A. Peters, N. Peykari, S.T. Pham, A. Pilav, F. Pitakaka, A. Piwonska, J. Piwonski, P. Plans-Rubio, M. Porta, M.L.P. Portegies, H. Poustchi, R. Pradeepa, J.F. Price, M. Punab, R.F. Qasrawi, M. Qorbani, R. Radisauskas, M. Rahman, O. Raitakari, S.R. Rao, A. Ramachandran, J. Ramke, R. Ramos, S. Rampal, W. Rathmann, J. Redon, P.F.M. Reganit, F. Rigo, S.M. Robinson, C. Robitaille, F. Rodriguez-Artalejo, M.D. Rodriguez-Perez, L.A. Rodriguez-Villamizar, R. Rojas-Martinez, K. Ronkainen, A. Rosengren, A. Rubinstein, O. Rui, B.S. Ruiz-Betancourt, A.R.V.R. Horimoto, M. Rutkowski, C. Sabanayagam, H.S. Sachdev, O. Saidi, S. Sakarya, B. Salanave, J.T. Salonen, M. Salvetti, J. Sanchez-Abanto, D. Santos, R.N. dos Santos, R. Santos, J.L. Saramies, L.B. Sardinha, N. Sarrafzadegan, K.U. Saum, M. Sczufca, H. Schargrotsky, C. Scheidt-Nave, A.A. Sein, S.K. Sharma, J.E. Shaw, K. Shibuya, Y. Shin, R. Shiri, R. Siantar, A.M. Sibai, M. Simon, J. Simons, L.A. Simons, M. Sjostrom, J. Slowikowska-Hilczer, P. Slusarczyk, L. Smeeth, M.B. Snijder, H.K. So, E. Sobngwi, S. Soderberg, V. Solfrizzi, E. Sonestedt, A. Soumare, J.A. Staessen, M.G. Stathopoulou, J. Steene-Johannessen, P. Stehle, A.D. Stein, J. Stessman, D. Stockl, J. Stokwizewski, K. Stronks, M.W. Strufaldi, C.A. Sun, J. Sundstrom, Y.T. Sung, P. Suriyawongpaisal, R.G. Sy, E.S. Tai, A. Tamosiunas, L. Tang, M. Tarawneh, C.B. Tarqui-Mamani, A. Taylor, H. Theobald, L. Thijs, B.H. Thuesen, H.K. Tolonen, J.S. Tolstrup, M. Topbas, M. Torrent, P. Traissac, O.T.H. Trinh, M.K. Tulloch-Reid, T.P. Tuomainen, M.L. Turley, C. Tzourio, P. Ueda, F.A.M. Ukoli, H. Ulmer, H.M.T. Uusitalo, G. Valdivia, D. Valvi, L. van Rossem, I.G.M. van Valkengoed, D. Vanderschueren, D. Vanuzzo, T. Vega, G. Velasquez-Melendez, G. Veronesi, W.M.M. Verschuren, R. Verstraeten, L. Viet, J. Vioque, J.K. Virtanen, B. Viswanathan, P. Vollenweider, S. Voutilainen, M. Vrijheid, A.N. Wade, A. Wagner, J. Walton, W.N.W. Mohamud, F. Wang, M.D. Wang, Q. Wang, Y.X. Wang, S.G. Wannamethee, D. Weerasekera, P.H. Whincup, K. Widhalm, A.H. Wijga, R.J. Wilks, J. Willeit, T. Wilsgaard, B. Wojtyniak, T.Y. Wong, J. Woo, M. Woodward, F.C. Wu, S.L. Wu, H.Q. Xu, W.L. Yan, X.G. Yang, X.W. Ye, A. Yoshihara, N.O. Younger-Coleman, S. Zambon, A.H. Zargar, T. Zdrojewski, W.H. Zhao, Y.F. Zheng, J.Z. Cisneros, N.R.F. Collaboration, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants, *Lancet* 387(10027) (2016) 1513-1530.

[42] L. Lara Rodriguez, P.A. Sundaram, E. Rosim-Fachini, A.M. Padovani, N. Difffoot-Carlo, Plasma electrolytic oxidation coatings on gammaTiAl alloy for potential biomedical applications, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102(5) (2014) 988-1001.

[43] E.C. Combe, B.A. Owen, J.S. Hodges, A protocol for determining the surface free energy of dental materials, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 20(3) (2004) 262-8.

[44] L.P. Faverani, V.A. Barao, G. Ramalho-Ferreira, M.B. Ferreira, I.R. Garcia-Junior, W.G. Assuncao, Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102(1) (2014) 22-30.

[45] E.R. Luvizuto, S.M. Dias, T.P. Queiroz, T. Okamoto, I.R. Garcia, R. Okamoto, R.C. Dornelles, Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene, *Bone* 46(4) (2010) 1021-9.

[46] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, I.R. Garcia, R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG

during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, *Arch Oral Biol* 55(1) (2010) 52-9.

[47] R.P. Abuna, F.S. De Oliveira, S. Santos Tde, T.R. Guerra, A.L. Rosa, M.M. Beloti, Participation of TNF-alpha in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation, *Journal of cellular physiology* 231(1) (2016) 204-14.

[48] G.P. Freitas, H.B. Lopes, A.L.G. Almeida, R.P.F. Abuna, R. Gimenes, L.E.B. Souza, D.T. Covas, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Potential of Osteoblastic Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue Associated with a Polymer/Ceramic Composite to Repair Bone Tissue, *Calcified tissue international* (2017).

[49] C. Maniopoulos, J. Sodek, A.H. Melcher, Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats, *Cell and tissue research* 254(2) (1988) 317-30.

[50] T.S. Santos, R.P. Abuna, L.M. Castro Raucchi, L.N. Teixeira, P.T. de Oliveira, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Mesenchymal Stem Cells Repress Osteoblast Differentiation Under Osteogenic-Inducing Conditions, *Journal of cellular biochemistry* 116(12) (2015) 2896-902.

[51] E. Hamade, G. Azzar, J. Radisson, R. Buchet, B. Roux, Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro: Influence of Ca²⁺ and nature of substrates, *European journal of biochemistry* 270(9) (2003) 2082-2090.

[52] P.J. Marie, Transcription factors controlling osteoblastogenesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473(2) (2008) 98-105.

[53] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrughe, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell* 108(1) (2002) 17-29.

[54] L. Yang, P. Cheng, C. Chen, H.B. He, G.Q. Xie, H.D. Zhou, H. Xie, X.P. Wu, X.H. Luo, miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization, *J Bone Miner Res* 27(7) (2012) 1598-606.

[55] P.T. de Oliveira, A. Nanci, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, *Biomaterials* 25(3) (2004) 403-13.

[56] P.T. de Oliveira, S.F. Zalzal, M.M. Beloti, A.L. Rosa, A. Nanci, Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography, *Journal of biomedical materials research. Part A* 80(3) (2007) 554-64.

[57] D. Krupa, J. Baszkiewicz, J. Zdunek, J.W. Sobczak, W. Lisowski, J. Smolik, Z. Slomka, Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 100(8) (2012) 2156-66.

[58] W.F. Pedrosa, Jr., R. Okamoto, P.E. Faria, M.F. Arnez, S.P. Xavier, L.A. Salata, Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone, *Clinical oral implants research* 20(11) (2009) 1254-64.

[59] N. Manrique, C.C. Pereira, E.R. Luvizuto, P. Sanchez Mdel, T. Okamoto, R. Okamoto, D.H. Sumida, C. Antoniali, Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats, *Clin Oral Investig* 19(6) (2015) 1319-27.

[60] L.P. Faverani, T.O.B. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A.C. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, *Clinical Oral Investigations* (2017).

[61] E.S. Ogawa, A.O. Matos, T. Beline, I.S. Marques, C. Sukotjo, M.T. Mathew, E.C. Rangel, N.C. Cruz, M.F. Mesquita, R.X. Consani, V.A. Barao, Surface-treated commercially pure titanium for biomedical applications: Electrochemical, structural,

- mechanical and chemical characterizations, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 65 (2016) 251-61.
- [62] I. Marques, M.F. Alfaro, N.C.D. Cruz, M.F. Mesquita, C. Takoudis, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms, *J Mech Behav Biomed Mater* 60 (2016) 8-21.
- [63] A.O. Matos, A.P. Ricomini-Filho, T. Beline, E.S. Ogawa, B.E. Costa-Oliveira, A.B. de Almeida, F.H. Nociti Junior, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A.R. Barao, Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface, *Colloids Surf B Biointerfaces* 152 (2017) 354-366.
- [64] J.M. Cordeiro, T. Beline, A.L.R. Ribeiro, E.C. Rangel, N.C. da Cruz, R. Landers, L.P. Faverani, L.G. Vaz, L.M.G. Fais, F.B. Vicente, C.R. Grandini, M.T. Mathew, C. Sukotjo, V.A.R. Barao, Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants, *Dent Mater* 33(11) (2017) 1244-1257.
- [65] E.G. Alves, R. Serakides, J.N. Boeloni, I.R. Rosado, N.M. Ocarino, H.P. Oliveira, A.M. Góes, C.M. Rezende, Comparative study of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue of adult dogs, *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36 (2016) 21-32.
- [66] D.-J. Chung, K. Hayashi, C.A. Toupadakis, A. Wong, C.E. Yellowley, Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia, *Research in veterinary science* 92(1) (2012) 66-75.
- [67] A. Kazek-Kesik, K. Kuna, W. Dec, M. Widziolek, G. Tylko, A.M. Osyczka, W. Simka, In vitro bioactivity investigations of Ti-15Mo alloy after electrochemical surface modification, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 104(5) (2016) 903-13.
- [68] T. He, C. Cao, Z. Xu, G. Li, H. Cao, X. Liu, C. Zhang, Y. Dong, A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Scientific reports* 7(1) (2017) 16270.
- [69] J. He, W. Feng, B.H. Zhao, W. Zhang, Z. Lin, In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits, *The International journal of oral & maxillofacial implants* 33(2) (2018) 298-310.
- [70] X. Lu, M. Mohedano, C. Blawert, E. Matykina, R. Arrabal, K.U. Kainer, M.L. Zheludkevich, Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – A review, *Surface and Coatings Technology* 307 (2016) 1165-1182.
- [71] T.S. Zaporozhets, A.V. Puz', S.L. Sinebryukhov, S.V. Gnedenkov, T.P. Smolina, N.N. Besednova, Biocompatibility of Modified Osteoinductive Calcium-Phosphate Coatings of Metal Implants, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 162(3) (2017) 366-369.
- [72] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, F.B. Prado, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 44(6) (2015) 798-805.
- [73] L.P. Faverani, T.O. Polo, G. Ramalho-Ferreira, G.A. Momesso, J.S. Hassumi, A.C. Rossi, A.R. Freire, F.B. Prado, E.R. Luvizuto, R. Gruber, R. Okamoto, Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats, *Clin Oral Investig* (2017).

C) Descrição e avaliação do apoio institucional recebido no período

As instalações do biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Prédio 5) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP foram utilizadas para o acondicionamento climatizado dos animais, assim como para a realização dos procedimentos cirúrgicos (ovariectomia, instalação dos implantes e eutanásia). O laboratório de processamento laboratorial do mesmo departamento foi utilizado para todo o protocolo metodológico das análises histológica (ratas jovens adultas e por fim, as ratas senis – 18 meses) e biomecânica. O processamento imunistoquímico foi realizado no Laboratório de Tecidos Mineralizados sob a coordenação da Profa. Associada Roberta Okamoto, do Departamento de Ciências Básicas da mesma instituição.

Os processamentos de caracterização topográfica e o método de texturização por PEO foram realizados no Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Faculdade de Engenharia do Campus de Sorocaba – UNESP, sob as colaborações dos Professores Nilson Cruz (Sorocaba) e Valentim Adelino Ricardo Barão (FOP-UNICAMP).

A análise pela microtomografia computadorizada foi realizada no laboratório multiusuário no campus universitário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os demais procedimentos laboratoriais para tecidos calcificados (microtomia em EXAKT e análise por microscopia confocal a laser) foram realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR – UNESP, sob a coordenação do professor Titular Élcio Marcantônio Júnior.

As análises de cultura de células primárias foram desenvolvidas na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP – USP, sob a supervisão do Prof Titular Adalberto Luiz Rosa.

D) Participação em evento científico

Os resultados parciais desta pesquisa foram apresentados na categoria “oral” durante o Congresso Internacional da IADR (International Association for Dental Research), realizado em Londres – Inglaterra, no período de 24 a 28 de julho de 2018. Em seguida, o certificado de “attendance” e a publicação do trabalho no “Special Issue” da JDR são apresentados aqui.



IADR
International Association
for Dental Research

VERIFICATION OF ATTENDANCE AND PRESENTATION

The International Association for Dental Research verifies that:

Leonardo Faverani

attended the IADR/PER General Session & Exhibition
in London, England, July 24-28, 2018, and presented the following research:

Peri-implant Osteogenesis of Biomimetic Coating in Osteoporotic Rats

ADA CERP® Continuing Education Recognition Program

ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.

Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or the Commission for Continuing Education Provider Recognition at ADA.org/CERP.

The International Association for Dental Research is an ADA CERP Recognized Provider.



Christopher H. Fox, D.M.D., D.M.Sc.
Executive Director

28/01/2019

IADR Abstract Archives - Peri-implant Osteogenesis of Biomimetic Coating in Osteoporotic Rats

IADR Abstract Archives

Peri-implant Osteogenesis of Biomimetic Coating in Osteoporotic Rats

Objectives: To assess the biomechanical and peri-implant osteogenesis of a biomimetic coating containing Ca and P deposited with plasma electrolytic oxidation (PEO) on the implants surface in osteoporotic rats.

Methods: 40 adults (6 months) Wistar female rats were divided into two groups: Ovx (subjected to the ovariectomy for osteoporosis induction) and Sham (ovariectomy fictional surgery). After 90 days, each tibia of the animal received one implant (2mm diameter and 4mm length) according to the coating method: PEO and AC (double etching-acid). All animals were euthanized at 42 days postoperatively. Half of the tibias were decalcified for histological (hematoxylin/eosin) and immunohistochemical (osteoprotegerin-OPG, RANKL, osteocalcin-OC and TRAP) analysis, and the others had the implants removed through reverse torque for the biomechanical analysis. The quantitative data from reverse torque was analyzed using 2-way ANOVA and post-hoc Holm-Sidak test ($P < 0.05$).

Results: The mean value of reverse torque (in N.cm) was higher for the PEO groups (Sham= 7.25 ± 1.7 ; Ovx= 5.75 ± 1.7) in comparison to the AC groups (Sham= 4.00 ± 0.81 ; Ovx= 2.00 ± 1.4 N.cm) ($P < 0.05$). The peri-implant osteogenesis in the histological evaluation showed greater newly bone formation in the PEO groups for both tested conditions (Sham and Ovx). Immunohistochemistry labeling showed similarity between PEO and AC for OPG, RANKL and TRAP proteins. OC showed slight labeling for the AC groups when compared to the PEO groups.

Conclusions: PEO seems to be a potential coating method for the future applications in biomedical implants.

Division: IADR/PER General Session

Meeting: 2018 IADR/PER General Session (London, England)

Location: London, England

Year: 2018

Final Presentation ID: 0613

Authors

- Faverani Leonardo (Unesp - Aracatuba Dental School , Araçatuba Araçatuba , Brazil)
- Silva William (Unesp - Aracatuba Dental School , Araçatuba Araçatuba , Brazil)
- Momesso Gustavo (Unesp - Aracatuba Dental School , Araçatuba Araçatuba , Brazil)
- Polo Tárík (Unesp - Aracatuba Dental School , Araçatuba Araçatuba , Brazil)
- Cordeiro Jairo (University of Campinas (Unicamp), School of Dentistry , Piracicaba Piracicaba , Brazil)
- Da Cruz Nilson (São Paulo State University (UNESP), School of Engineering , Sorocaba Sorocaba , Brazil)
- Barão Valentim (University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba Piracicaba , SP , Brazil)
- Okamoto Roberta (UNESP , Araçatuba Araçatuba , São Paulo , Brazil)

Financial Interest Disclosure: São Paulo Research Foundation - FAPESP (# 2016/16356-7; 2016/20297-6)

SESSION INFORMATION

Oral Session

Wound Healing & Tissue Regeneration Research

Thursday, 07/26/2018 , 08:00AM - 09:30AM

<https://iadrabstractarchives.com/abstract/138-ag-2949261/peri-implant-osteogenesis-of-biomimetic-coating-in-osteoporotic-rats>

1/2

E) Lista das publicações resultantes do auxílio - Relatório Científico Final (2)

Nenhum artigo ainda foi enviado em função das análises serem finalizadas no fim de janeiro de 2019. Portanto, já estamos dividindo os resultados nos artigos e enviaremos para a publicação ainda no mês de março do corrente ano. Portanto, a seguir, os trabalhos apresentados nos eventos, publicações em anais ou periódicos e as premiações, serão listadas.

1) Trabalhos apresentados em eventos.

1.1 NAKASATO, K. L.; MOMESSO, G. A. C.; POLO, TOB; SILVA, W. P. P.; CORDEIRO, J. M.; BARAO, V. A. R.; OKAMOTO, R.; FAVERANI, L.P. Estudo preliminar do potencial bioativo da texturização de implantes por oxidação com plasma eletrolítico em ratas osteoporóticas. *Trabalho apresentado na categoria “Painel Iniciante” ligado a bolsa de iniciação científica FAPESP (processo 2016/16356-7) durante a 34ª Reunião Anual da SBPqO em Campinas (3 a 6 de setembro de 2017).*

1.2 NAKASATO KL*, MOMESSO GAC, POLO TOB, SILVA WPP, CORDEIRO JM, BARÃO VAR, OKAMOTO R, FAVERANI LP. Avaliação histológica e biomecânica do osso ao redor de implantes com texturização de superfície produzida por Oxidação Eletrolítica por Plasma e incorporada com Ca e P em ratas osteoporóticas. *Trabalho apresentado na categoria “Painel” ligado a bolsa de iniciação científica FAPESP (processo 2016/16356-7) durante a 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, em Araçatuba (23 de setembro de 2017).*

1.3 BARBOSA S*, SILVA WPP, MOMESSO GAC, POLO TOB, CORDEIRO JM, SANTOS JMF, BARAO VAR, FAVERANI LP. Caracterização topográfica e histológica da osteogênese ao redor de implantes anodizados por plasma eletrolítico. *Trabalho apresentado na categoria “Oral” durante o 8º Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (23 a 26 de maio de 2018).*

1.4 BARBOSA S*, SANTOS JMF, MOMESSO GAC, POLO TOB, SILVA WPP, CORDEIRO JM, BARAO VAR, FAVERANI LP. Análise topográfica da texturização em miniplacas para fixação de fraturas ósseas em ratas osteoporóticas: Resultados Preliminares. *Trabalho apresentado na categoria “Painel” ligado a bolsa de iniciação científica FAPESP (processo 2018/00522-0) durante a 35ª Reunião Anual da SBPqO em Campinas (2 a 4 de setembro de 2018).*

1.5 MENDES, BC*; MOMESSO, GAC; DA SILVA, WPP; POLO, TOB; OKAMOTO, R, FAVERANI, LP. – A influência da texturização de superfície do implante pela oxidação por plasma eletrolítico em ratas osteoporóticas. *Trabalho apresentado na categoria “Painel” na área de IMPLANTODONTIA, ligado ao auxílio FAPESP (processo 2016/20297-6), no 31º Congresso Odontológico de Bauru “Prof. Dr. José Mondeli, no dia 17 de maio de 2018, na Faculdade de Odontologia de Bauru- USP.*

1.6 MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; SILVA, W.P.P.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P. Texturização com oxidação por plasma eletrolítico otimiza o reparo peri-implantar em ratas com ossos de baixa densidade. *Trabalho apresentado na categoria “Apresentação Oral” ligado ao auxílio (processo 2016/20297-6) durante a 35ª Reunião Anual da SBPqO em Campinas (1 a 4 de setembro de 2018).*

1.7 SILVA, W.P.P.; MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P. Análise do reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por oxidação por plasma eletrolítico. *Trabalho apresentado na categoria “Painel Aspirante” ligado ao auxílio (processo 2016/20297-6) durante a 35ª Reunião Anual da SBPqO em Campinas (1 a 4 de setembro de 2018).*

2) Publicação de trabalhos apresentados

2.1 NAKASATO, K. L.; MOMESSO, G. A. C.; POLO, TOB; SILVA, W. P. P.; CORDEIRO, J. M.; BARAO, V. A. R.; OKAMOTO, R.; FAVERANI, L.P. Estudo preliminar do potencial bioativo da texturização de implantes por oxidação com plasma eletrolítico em ratas osteoporóticas In: 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de pesquisa Odontológica, 2017, Campinas. **Brazilian Oral Research.**, 2017. v.31. p.142 – 142.

2.2 BARBOSA, S.; SILVA, W. P. P.; MOMESSO, G. A. C.; POLO, T. O. B.; CORDEIRO, J. M.; SANTOS, J. M. F.; BARAO, V. A. R.; FAVERANI, L. P. Caracterização topográfica e histológica da osteogênese ao redor de implantes anodizados por plasma eletrolítico. In: 8º Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2018, Araçatuba. **Arch Health Invest.**, 2018. V.7. p. 101.

2.3 BARBOSA, S.; SANTOS, J. M. F.; MOMESSO, G. A. C.; POLO, T. O. B.; SILVA, W. P. P.; CORDEIRO, J. M.; BARAO, V. A. R.; FAVERANI, L. P. Análise topográfica da texturização em miniplacas para fixação de fraturas ósseas em ratas osteoporóticas: Resultados Preliminares. In: 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. **Brazilian Oral Research.**, 2018. V.32. p. 94.

2.4 MENDES, BC; MOMESSO, GAC; DA SILVA, WPP; POLO, TOB; OKAMOTO, R, FAVERANI, LP. – A influência da texturização de superfície do implante pela oxidação por plasma eletrolítico em ratas osteoporóticas. In: **31º Congresso Odontológico de Bauru “Prof. Dr. José Mondeli, Faculdade de Odontologia de Bauru- USP. Anais do 31º Congresso Odontológico de Bauru,** 2018. p. 517.

2.4 MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; SILVA, W.P.P.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P. Texturização com oxidação por plasma eletrolítico otimiza o reparo peri-implantar em ratas com ossos de baixa densidade In: 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. **Brazilian Oral Research.**, 2018. v.32. p.79 – 79.

2.5 SILVA, W.P.P.; MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P. Análise do reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por oxidação por plasma eletrolítico In: 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. **Brazilian Oral Research.**, 2018. v.32. p.475 – 475.

2.6 SILVA, W.P.P.; MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P. Análise do reparo ósseo

periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por oxidação por plasma eletrolítico In: 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. **Brazilian Oral Research.**, 2018. v.32. p.475 – 475.

3) Premiações com os trabalhos apresentados

3.1 Menção honrosa com o trabalho intitulado: *Avaliação histológica e biomecânica do osso ao redor de implantes com texturização de superfície produzida por Oxidação Eletrolítica por Plasma e incorporada com Ca e P em ratas osteoporóticas*, pelos autores NAKASATO KL*, MOMESSO GAC, POLO TOB, SILVA WPP, CORDEIRO JM, BARÃO VAR, OKAMOTO R, FAVERANI LP, durante o XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.

3.2 Primeiro Lugar, da área 1, na modalidade Prêmio Myaki Issao com o trabalho intitulado: *Análise topográfica da texturização em miniplacas para fixação de fraturas ósseas em ratas osteoporóticas: Resultados Preliminares*. BARBOSA S*, SANTOS JMF, MOMESSO GAC, POLO TOB, SILVA WPP, CORDEIRO JM, BARAO VAR, FAVERANI LP, durante a 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2018.

3.3 Menção honrosa com o trabalho intitulado: *Texturização com oxidação por plasma eletrolítico otimiza o reparo peri-implantar em ratas com ossos de baixa densidade*, pelos autores MOMESSO, G.A.C.; POLO, T.O.B.; SILVA, W.P.P.; CORDEIRO, J.M.; CRUZ, N.C.; OKAMOTO, R.; BARÃO, V.A.R.; FAVERANI, L.P, durante a 35ª Reunião Anual da SBPqO.

F) Dissertação defendida ligada ao auxílio

O presente auxílio teve a seguinte dissertação relacionada, conforme os comprobatórios abaixo: Página de rosto e ata da defesa, em que constam as assinaturas da banca examinadora.

**CULTURA DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS
PRIMÁRIAS A PARTIR DE OSSO DE BAIXA
DENSIDADE E ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO
PERIIMPLANTAR EM RATAS
OSTEOPORÓTICAS EM FUNÇÃO DA
TEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MEIO DA
OXIDAÇÃO POR PLASMA ELETROLÍTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)

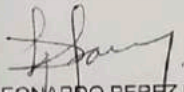
Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coorientadora: Prof.^a Associada Roberta Okamoto

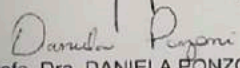
Araçatuba – SP


2019

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 25 dias do mês de janeiro do ano de 2019, às 08:30 horas, no(a) Anfiteatro do CAOE (Câmpus - Rodovia), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEONARDO PEREZ FAVERANI - Orientador(a) do(a) Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada / Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Profa. Dra. DANIELA PONZONI do(a) Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada / Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Profa. Dra. ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM do(a) Faculdade de Odontologia / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de WILLIAM PHILLIP PEREIRA DA SILVA, intitulada **Cultura de células osteogênicas primárias a partir de osso de baixa densidade e análise do reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas em função da texturização de superfície por meio da oxidação por plasma eletrolítico**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. LEONARDO PEREZ FAVERANI


Profa. Dra. DANIELA PONZONI


Profa. Dra. ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM

