

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RODRIGO PAES VILA REAL

INFLUÊNCIA DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM  
HIDRÓXIDO DE SÓDIO NO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS  
TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

RIBEIRÃO PRETO

2020

Rodrigo Paes Vila Real

INFLUÊNCIA DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM  
HIDRÓXIDO DE SÓDIO NO METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS  
TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Ribeirão Preto

2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico  
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Vila Real, Rodrigo Paes, 1975 -  
R744i Influência da modificação da superfície de titânio com hidróxido  
de sódio no metabolismo de osteoblastos tratados com ácido  
zoledrônico / Rodrigo Paes Vila Real. - - Ribeirão Preto, 2020.  
45 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gonçalves Basso.

Monografia (pós-graduação) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Odontologia, área de concentração: Implantodontia.  
Ribeirão Preto, 2020.

1. Ácido zoledrônico. 2. Implantes dentários. 3. Osteoblastos.  
4. Alcalinização. I. Título.

CDD 617.692

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus**, por ser tão presente no meu coração, por me amparar e ajudar a desenvolver o meu propósito maior. Por toda coragem, luz, determinação e força durante essa nova fase da minha vida.

À minha alma gêmea, **Vanessa Martinez de Camargo Vila Real**, que suportou a minha ausência nesse período, cuidou majestosamente de nossos pequenos, sendo o carinho e o calor da nossa casa, Deus a colocou em meu caminho para torna-lo mais fácil, ombro que me acolhe. Tantos desafios juntos e tantas vitórias. Obrigado meu amor!!!

Aos meus pais, **Daniel Alves Vila Real** (*in memoriam*) e **Maria Alice Paes Vila Real**, por todo ensinamento, incentivo e educação para a vida, sem os quais eu não seria o que sou. Ao não ter sua presença física aqui pai, para mais esse momento de vitória, sinto um nó na garganta, quanta saudade. Mas a certeza do colo da mãe consola e me mantém seguro. Obrigado a vocês dois pela honestidade, coragem de lutar e trabalhar, dignidade e tantos outros atributos que foram e ainda são a grande Escola da minha vida.

Aos meus pequenos **Tiago e João de Camargo Vila Real**, pelo abraço carinhoso da chegada, a bagunça espalhada e o sorriso maroto de quem ama a vida e derrama esse amor aos seus pais, meus meninos, obrigado. Presentes especiais que O Pai me deu a graça de poder cuidar. Vocês são parte do meu coração.

Aos meus sogros **Paulo Roberto de Camargo e Célia Maria Martinez de Camargo**, sempre nos apoiando e incentivando, além do suporte em tantas horas da vida de nossa casa.

Aos meus irmãos **Rafael Paes Vila Real e Roberto Paes Vila Real**, na distancia de Bauru vocês cuidam de nossa raiz, privilégio que eu não tenho. Obrigado pelo amor de vocês a nossa mãe e pelos nossos encontros barulhentos e cheios de vida.

Cunhado e cunhadas, **Alessandro, Isabela, Brunna e Rafaela**, os tenho em alta conta e sei que a torcida de vocês sempre foi presente. Obrigado pelo carinho.

Aos meus amigos da Odontoclínica de Aeronáutica Santos Dumont que de longe me inspiraram a buscar a realização de um sonho, em especial a hoje **Major e Doutora Marcela Ferraz Catramby** e ao irmão de arma e **Doutor Daniel Costa Ferreira de Almeida**. Vocês um dia me permitiram ver novos horizontes na Odontologia.

O convívio com os excelentes profissionais de elevado padrão científico, que não se deixam esconder sob a burocracia que os cobre, mas que desenvolvem uma Odontologia de alto padrão da **Subdivisão de Odontologia do Esquadrão de Saúde de Pirassununga**.

Aos meus professores de graduação da Universidade do Sagrado Coração, que como grandes mestres me deram a oportunidade de vislumbrar na Odontologia “Profissão dos Inventores” como diria **Dr. Luis Casati Alvares**, mas a tantos outros professores e amigos que ensinaram e registraram em mim, o valor e grandiosidade da Odontologia como a **Dra. Flávia Noemy Gasparini Kiatake Fontão, Dra. Patricia Saraiva, Dr. Hugo Nary Filho, Luís Eduardo Marques Padovan**, e tantos outros que conduziram as minhas mãos para uma atividade odontológica firme e eficaz, graças aos seus primeiros ensinamentos hoje posso, em uma auto avaliação, dizer que a Odontologia encontrou casa neste aluno da **Sexta Turma** de Odontologia da **Universidade do Sagrado Coração**.

Não tenho como deixar de referenciar meus Mestre em meu período de Residência em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, junto ao Hospital de Base de Bauru, **Dr. Daniel Luiz Gardner Zorzetto**, e **Dr. Claudio Pastori**, que me receberam, incentivaram e formaram-me para as dificuldades e sucessos da Cirurgia Buco-Maxilo, meu muito obrigado professores.

Ao Grande Amigo, **José Thiers Carneiro Junior**, a quem tenho a obrigação de chamar de **Doutor** pelo que é, pilar e defensor da **CTBMF**, um soldado de grandes lutas, que encontra em sua pessoa o Justo e o Perfeito da especialidade (Cirurgia) que guarda o nome de nossa profissão. Deixar Belém foi necessário, mas ficou a saudade do convívio, dos ensinamentos, das batalhas para fazer uma buco-maxilo forte. Minha casa, sua casa meu irmão, aqui estou em Pé e a Ordem para o que for preciso.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora, **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso** pela vastidão de seu conhecimento, mas sua sutileza de lapidar a pedra bruta, a sua facilidade de tirar do tosco algo tão complexo e elaborado me impressiona. Por ensinar algo novo, instruir e incentivar uma nova jornada para um caminho não tão velho, mas já experimentado. Desejo que Deus possa abençoar ricamente a família da senhora. Esse momento muitas vezes parece uma obrigação, mas afirmo peremptoriamente que não há nada de *pro forma*, mas é sim um Muitíssimo Obrigado pela sua generosidade em compartilhar tão largo conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Dra. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**, personalidade constante e pioneira na educação nacional. Obrigada pela oportunidade de poder concretizar mais esse sonho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara T. C. Silva Sousa**, que me acolheu em minha nova casa. Graduado pela USC, hoje sou também UNAERP de coração. A sabedoria da senhora em acolher novos alunos, que já não são tão novos, dá vida a nós que chegamos e também a Instituição e com certeza, sem a maestria de sua batuta o êxito da missão não seria alcançado.

Ao corpo docente do curso do Programa de Pós-graduação da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva, Profa. Dra. Andrea Marcaccini, Prof. Dr. Carlos Miranda, Prof. Dr. Celso Bernardo de Sousa Filho, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edílson Carlos Caritá, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris, Dra. Larissa M. S. C. Raucci, Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva Prof. Dr. Walter Raucci Neto e a Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Ms. José Roberto de Freitas**, pelo companherismo e orientação na elaboração dos trabalhos relativos ao ciclo de integração entre alunos da Pós-graduação e Graduação do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto.

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, pela atenção e carinho que tiveram, em especial a equipe do LIAPE, da pós graduação, biblioteca, profissionalismo e cordialidade sempre foram a estampa de seu trabalho.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela boa convivência que tivemos durante o curso. Em especial aos meus amigos **Evandro Tronco, Stephanie Francoi Poole, Antônio Secco Martorano, Fernanda Mara Saltareli, Aline Ferreira Borges, Elizabeth Helena**

**Brazão, Leticia Moretti, Adriely Fracaroli Baltazar, e Mariana Guerreiro de Almeida** obrigada pelo companheirismo e camaradagem.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, onde desenvolvemos as pesquisas que ampararam esse estudo.

Ao Comando da Aeronáutica e do Esquadrão de Saúde de Pirassununga, por incentivar o crescimento científico de seus profissionais, permitindo que voem cada vez mais alto e busquem realizar seus sonhos. Em especial ao comandante do **Esquadrão de Saúde de Pirassununga**, ao senhor coronel médico, **Édson Cassio Aguirre de Souza**, e aos meus chefes imediatos **Majores Dentistas Alexandre Afonso Bittar e Fernanda Al-Behy André**, que permitiram que esse sonho se tornasse realidade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.



*“O bonito não é realizar o nosso próprio sonho, mas realizar o sonho de DEUS.”*  
*Pe. Jonas Abib*

## RESUMO

A instalação de implantes de titânio em pacientes em pacientes usuários de medicamentos antirreabsortivos como o ácido zoledrônico (AZ) é controversa e pode resultar em falhas na osseointegração. A modificação superficial dos implantes através da solução de hidróxido de sódio proporciona uma aceleração do reparo do tecido ósseo e favorece assim a osseointegração dos implantes. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da modificação da superfície de implantes com hidróxido de sódio (NaOH) no metabolismo de osteoblastos tratados com ácido zoledrônico (AZ) *in vitro*. Foram utilizados discos de titânio polidos e tratados com solução de hidróxido de sódio. A rugosidade dos discos foi determinada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV; n=2) e por microscopia confocal (n=6). Os osteoblastos foram cultivados ( $5 \times 10^4$  células/disco) sobre os discos previamente alocados em placas de 24 compartimentos em meio de cultura DMEM completo. Após 24 horas, estas células foram tratadas com AZ na concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$ . Após 7 dias, foram avaliadas a viabilidade celular (AlamarBlue; n=6), a síntese de colágeno (Sirius Red; n=6), produção de proteína total (ensaio de Lowry; n=6), atividade de fosfatase alcalina (ALP; n=6) e deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red; n=6). Os resultados qualitativos da análise da rugosidade foram analisados descritivamente. Os dados quantitativos de rugosidade foram avaliados por meio do teste paramétrico t-Student, enquanto os dados de metabolismo e diferenciação celular foram analisados por meio do teste estatístico ANOVA a dois critérios, com pós teste de Tukey, considerando nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que a modificação de superfície resultou em aumento significativo da rugosidade superficial dos discos, revelada por meio da MEV e da microscopia confocal ( $p < 0,05$ ). Esta modificação também resultou em maior viabilidade, síntese de colágeno, produção de proteína total e atividade de ALP pelos osteoblastos quando comparados às células cultivadas sobre os discos polidos ( $p < 0,05$ ). Na presença do AZ, todos os parâmetros de metabolismo e diferenciação celular foram significativamente reduzidos para as células cultivadas sobre os discos polidos e modificados por NaOH ( $p < 0,05$ ), porém, os osteoblastos cultivados sobre as superfícies modificadas apresentaram maiores valores para estes parâmetros, exceto para a deposição de nódulos mineralizados ( $p < 0,05$ ), sendo a atividade de ALP similar ao grupo não exposto ao AZ. Assim, a modificação de superfícies de titânio com solução de NaOH pode ser uma alternativa promissora na indução do metabolismo e diferenciação de osteoblastos e aceleração da osseointegração de implantes orais, principalmente para tecidos em contato com AZ.

**Palavras-chave:** Ácido zoledrônico. Implantes dentários. Osteoblastos. Alcalinização.

## ABSTRACT

The installation of oral implants has increased over the years according to the increased life expectancy. Patients subjected to the rehabilitation with osseointegrated implants frequently present systemic diseases. Among these complications, bone metabolic diseases, such as osteoporosis are highly incident. These diseases are mainly treated with antiresorptive agents, such as bisphosphonates, like Zoedronic Acid (ZA). Bisphosphonates promote the apoptosis of osteoclasts and other oral cells and inhibit bone remodeling, therefore, limiting surgical procedures such as tooth extractions, implant installation and periodontal procedures. Therefore, the installation of implants in patients under bisphosphonates therapy is controversial and may be related to failures in osseointegration. Surface modification by sodium hydroxide promotes an acceleration on bone healing and favors osseointegration. This investigation aimed to evaluate the effect of modification of titanium surface with NaOH on the metabolism of osteoblasts using an *in vitro* model. Machined and NaOH-treated titanium discs were used. Osteoblasts were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/disc) onto the discs previously placed in 24-well plates using complete DMEM culture medium. After 24 hours, cells were treated with AZ at  $5\mu\text{M}$ . After 7 days, cell viability, collagen synthesis, alkaline phosphatase activity (ALP), mineral nodule deposition and calcium identification were assessed. Data were analyzed by ANOVA and Tukey tests, at 5% significance level. Results demonstrated that surface treatment increased all parameters for osteoblast metabolism, while ZA-treatment resulted in decrease of all cell functions. Cells seeded onto NaOH-treated discs and treated with ZA presented better results than those cells seeded onto machined discs and treated with ZA. Therefore, this seems to be a suitable alternative to induce osteoblasts metabolism and accelerate osseointegration, mainly for tissues in contact with ZA.

**Key-words:** Zoledronic acid. Dental implants. Osteoblasts. Alkalinization.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
	Objetivos específicos.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	17
3.2	OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO.....	17
3.3	TRATAMENTO TÉRMICO ALCALINO.....	18
3.4	ANÁLISE QUALITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	19
3.5	ANÁLISE QUANTITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	19
3.6	CULTURA DE OSTEOBLASTOS HUMANOS.....	20
3.7	TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO (AZ).....	20
3.8	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	21
3.9	SINTESE DE COLÁGENO.....	22
3.10	PRODUÇÃO DE PROTEINA TOTAL.....	23
3.11	ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA.....	24
3.12	DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO.....	25
3.13	ANÁLISE DOS DADOS.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	27
4.1	ANÁLISE QUALITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	27
4.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	28
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	29
4.4	SINTESE DE COLÁGENO.....	29
4.5	PRODUÇÃO DE PROTEINA TOTAL.....	30
4.6	ATIVIDADE DE ALP.....	31
4.7	DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO.....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

# 1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma sociedade costuma ser demonstrado através de diversos meios, contudo, o tempo médio de vida de um indivíduo é um dos parâmetros mais utilizados; no Brasil no início dos anos 1900 a população tinha uma expectativa de vida de 33,7 anos, no entanto, em 2019, o relatório do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstrou que a expectativa de vida da população brasileira alcançou a média de 76,3 anos (IBGE, 2019). Tal fato imputa a responsabilidade aos profissionais de saúde bucal de proporcionar a seus pacientes meios de reabilitação cada vez mais atualizados. Durante muitas décadas o tratamento do edentulismo parcial ou total foi limitado ao uso de próteses fixas ou removíveis parciais ou totais, porém, estas podem promover desajustes como irritações ao tecido gengival, disfagia, dores orofaciais e disfunção da articulação temporomandibular e como consequências desses desajustes, surgem deficiências nutricionais, alterações psicológicas e limitação de integração social (ATWOOD & COY, 1971; CAWOOD & HOWELL, 1991; COOPER, 2009).

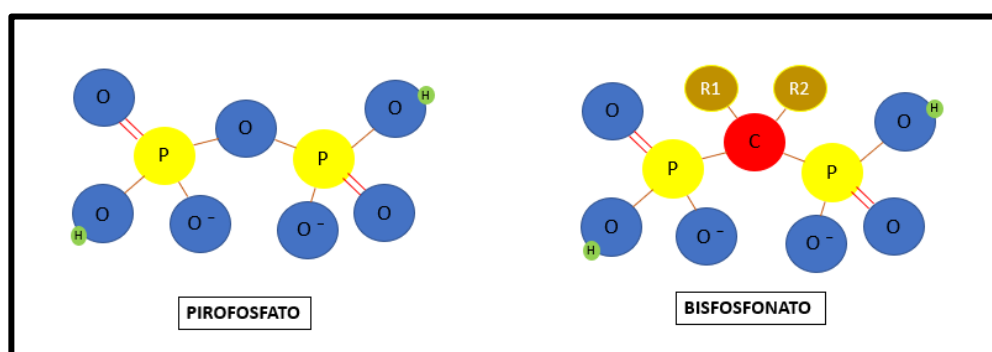
Há aproximadamente 50 anos, em Gotemburgo, na Suécia, o professor Doutor Per-Ingvar Brånemark observou em um estudo in vivo cujo objetivo era avaliar a microcirculação endóssea, que as câmaras de titânio instaladas em fíbulas de ratos apresentavam uma firme adesão ao tecido ósseo destes animais (BRÅNEMARK et al., 1977). Neste estudo, os pesquisadores também observaram que o titânio havia se integrado ao tecido ósseo, ao contrário de outros materiais empregados, os quais demonstravam apenas uma justaposição ao tecido em que estavam inseridos (BRÅNEMARK et al., 1977). Assim ocorreu o advento da osseointegração, que se apresenta como uma ancoragem estável ao tecido ósseo, sem que para esse efeito seja necessário a introdução de qualquer tipo de agente cimentante entre o biomaterial implante e este tecido (ALBREKTSSON et al., 1981; VAN STEENBERGHE et al., 1991). Essa modalidade terapêutica transformou o conceito de cirurgia pré-protética em Odontologia, tendo já na década de 80 demonstrado sua longevidade como uma terapia reabilitadora (ADELL et al., 1986; ALBREKTSSON et al., 1986).

Originalmente, o processo de osseointegração foi definido como uma conexão estrutural e funcional do biomaterial com o tecido ósseo vivo, capaz de suportar cargas funcionais (BRÅNEMARK et al., 1977). Atualmente, esta classificação também considera aspectos clínicos, como a ausência de mobilidade do implante (GUGLIELMOTTI et al., 2019).

Alguns fatores locais e sistêmicos podem influenciar este processo. Entre os fatores locais podemos citar a morfologia do tecido receptor para o biomaterial, volume ósseo (dimensões verticais e horizontais) assim como aspectos relacionados a classificação da densidade do tecido ósseo, a vascularização óssea, sendo que este fator está diretamente relacionado a capacidade de reparo do tecido ósseo receptor, a condição odontológica avaliada na oroscopia do paciente, com principal relação à saúde periodontal, devido a estrita relação entre o implante e os tecidos de sustentação orais (KULLAR & MILLER, 2019). Considerando os fatores sistêmicos que podem afetar negativamente o processo de osseointegração dos implantes orais, o diabetes, as discrasias sanguíneas, hepatopatias, além de alterações metabólicas como a osteoporose e estão associados a uma menor capacidade de reparo dos tecidos ósseos (KULLAR & MILLER, 2019).

O uso de alguns medicamentos antirreabsortivos como os bisfosfonatos (BF) também é descrito como fator de contra-indicação relativa para a instalação de implantes osseointegrados orais (RUGGIERO et al., 2014) Os BF são derivados dos pirofosfato inorgânico endógeno (PIE), substância que interfere na dissolução e precipitação do fosfato de cálcio, principal componente inorgânico do osso mineralizado e regula o metabolismo ósseo (RUSSELL, 2011). Estes medicamentos foram desenvolvidos a partir da modificação da molécula PIE, substituindo um átomo de oxigênio por um átomo de carbono, associado a outros radicais, conferindo a esta nova molécula maior capacidade de adesão aos cristais de hidroxiapatita e menor degradação hidrolítica (KAMEL, 2015) (Figura 1).

Figura 1. Estruturas moleculares dos bisfosfonatos e pirofosfato



Fonte: autor.

Os BF são prescritos para aproximadamente 220 milhões de pessoas no mundo, o que equivale a dizer que cerca de 2,6% da população mundial, ou uma população igual a do Brasil, faz uso de algum bisfosfonato (CHADHA et al., 2013). Estes são indicados para doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose e a doença de Paget, bem como

neoplasias do tecido ósseo, o mieloma múltiplo, além de metástases ósseas dos cânceres de mama, próstata e pulmonar (MADRI & SANZ, 2009; RUSSELL, 2011).

Existem dois grandes grupos de BF, os nitrogenados e não-nitrogenados. (RUSSELL, 2011). A presença do nitrogênio em um de seus radicais resulta em maior adesão aos cristais de hidroxiapatita e também maior potência antirreabsortiva do medicamento. Estes medicamentos também apresentam diferentes formas de administração, podendo ser dispensados aos pacientes que os utilizam por via oral ou acesso endovenoso, sendo a inoculação endovenosa da droga aquela que apresenta maior distribuição do fármaco para os tecidos, bem como maior adesão e potência (RUSSELL, 2011).

O ácido zoledrônico (AZ) é um BF nitrogenado, que apresenta alta potência e capacidade de adesão aos cristais de hidroxiapatita do tecido ósseo, de tal maneira que mesmo após vários anos apresenta alta biodisponibilidade. Além disso, este medicamento apresenta potencial antirreabsortivo exponencialmente maior que os demais, apresentando um potencial 10.000 vezes superior ao etidronato, 100 a 1000 vezes superior ao pamidronato e 20 vezes superior ao alendronato (COLEMAN, 2001; LAWSON et al., 2010). Tabela I.

Tabela I. Potência antirreabsortiva dos bisfosfonatos e estrutura molecular de seus radicais

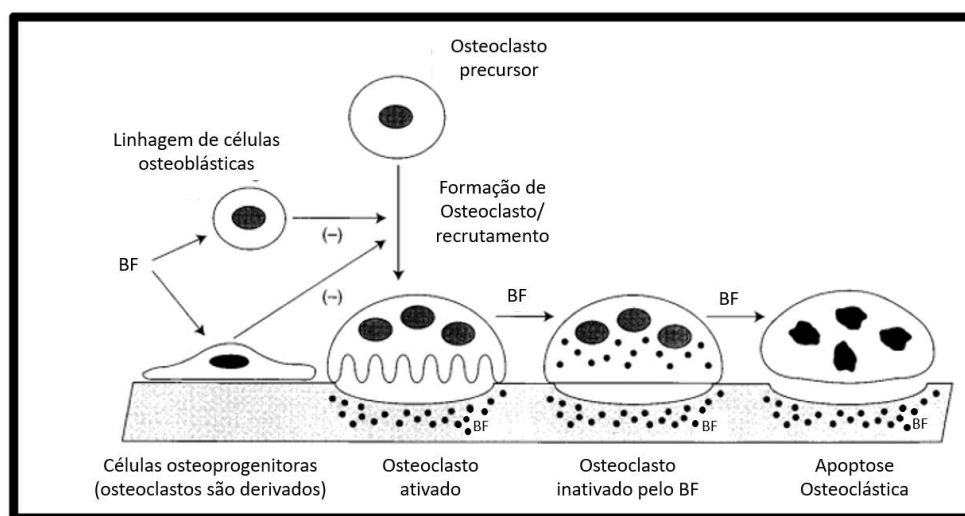
BISFOSFONATO	Radical 1	Radical 2	Potência
Clodronato	Cloro	Cloro	10
Etidronato	OH	CH <sub>3</sub>	1
Pamidronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	100
Alendronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	500
Ibandronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	1.000
Residronato	OH	CH <sub>2</sub> -3-piridina (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N)	2.000
Ácido Zoledrônico	OH	CH <sub>2</sub> -imidazol (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> )	10.000

Fonte: autor

Após a administração, os BF aderem aos cristais de hidroxiapatita dos tecidos mineralizados e são liberados a partir de eventos inflamatórios e/ou traumáticos (BODY & MANCINI 2002). Estes medicamentos atuam por meio da indução de apoptose de osteoclastos, bem como na inibição a maturação de pré-osteoclastos, inibindo a remodelação óssea (OLIVEIRA et al., 2017) (Figura 2).

Porém, estudos *in vitro* (ORRISS et al., 2009; RAVOSA et al., 2011; BASSO et al., 2014) e *in vivo* (PACHECO et al., 2015; KÜN-DARBOIS et al., 2018) demonstraram que os BF apresentam alta toxicidade sobre outras células, como os osteoblastos, e que também pode afetar o processo de aposição do tecido ósseo; estas células, em contato com estes medicamentos, apresentaram menor viabilidade, proliferação, migração, síntese de colágeno, atividade de fosfatase alcalina e deposição de matriz mineralizada.

Figura 2. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos.



Fonte: adaptado de RODAN & FLEISCH, 1996.

A cavidade oral apresenta intensa vascularização, o que facilita a distribuição destes medicamentos, e também apresenta altas taxas de remodelação óssea, o que também favorece a liberação dos BF nos tecidos orais (OTTO et al., 2010). Além disso, a realização de procedimentos cirúrgicos como exodontias e a instalação de implantes osseointegrados está diretamente relacionada a eventos traumáticos e inflamatórios, o que induz a liberação destes medicamentos nos sítios ósseos eletivos para a instalação de implantes e a depender do tipo de BF, bem como dose e via de administração, o processo de remodelação óssea para osseointegração do implantes dentários pode ser significativamente prejudicado (DE-FREITAS et al., 2016).

A instalação de implantes osseointegrados em pacientes que fazem uso de BF é controversa, devido ao risco de atraso no processo de osseointegração e perda dos implantes (DE-FREITAS et al., 2016). Autores como LAZAROVICI et al., (2010), apresentam um índice de 18,6% de perda de implantes quando estes pacientes estavam sob terapia com BF orais ou endovenosos; CHADHA et al., (2013) registra que aproximadamente 12% dos



pacientes que utilizam bisfosfonatos endovenosos tiveram perdas de implantes instalados. Em uma revisão sistemática extensa, avaliando 528 pacientes que utilizavam algum tipo de bisfosfonato e que foram submetidos a instalação de implantes, a taxa de perda destes foi de 8,49% (113 implantes) em um total de 1330 implantes instalados (DE-FREITAS et al., 2016). Ainda segundo estes autores, as falhas no reparo de implantes osseointegrados em pacientes em uso de bisfosfonatos podem estar relacionadas ao tipo de BF, sendo o grupo nitrogenado o mais frequentemente associado e também à concentração do medicamento no tecido, que por sua vez, está diretamente relacionada ao regime de tratamento utilizado pelo paciente (CHADHA et al., 2013; DE-FREITAS et al., 2016).

Outro efeito adverso observado em pacientes que fazem uso de BF são as osteonecroses induzidas por BF (*Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw* – BRONJ). Esta condição é caracterizada por área de tecido ósseo necrótico exposta na cavidade oral, por mais de 8 semanas, em pacientes que fazem uso de BF, sem histórico de radioterapia de cabeça e pescoço (MARX, 2003). A partir de estudos que demonstraram que esta condição também tem sido observada em pacientes que utilizam outros medicamentos antirreabsortivos e anti-angiogênicos, sua nomenclatura foi atualizada para “*Medication-related osteonecrosis of the jaw*” – MRONJ (RUGGIERO et al., 2014).

Desta forma, a aplicação de tecnologias sobre os materiais que possibilitem melhorar o metabolismo das células ósseas mesmo na presença de medicamentos como os BF, é de grande importância para o tratamento reabilitador deste grupo de pacientes e uma das estratégias atualmente utilizadas para acelerar o processo de reparo de implantes osseointegrados orais é a modificação da superfície de titânio. Estas modificações visam principalmente aumentar a superfície de contato dos implantes com o tecido ósseo adjacente, por meio do aumento da rugosidade superficial (TRENTO et al., 2020). Este aumento de rugosidade, por sua vez, promove um maior embricamento mecânico dos implantes, além de fornecer melhores condições para a adesão, espraçamento e produção proteica pelos osteoblastos (DEGASNE et al., 1999; GERZON et al., 2013).

Tais modificações podem ser realizadas por meio de jateamento de partículas, polimento mecânico (ALLA et al., 2011), eletropolimento, oxidação anódica, tratamentos ácidos (LARSSON et al., 1996) ou ainda por tratamentos alcalinos (KOKUBO et al., 2004) e lasers de alta potência, (MARISCAL-MUÑOZ et al., 2015).

A modificação de superfície por meio de soluções alcalinas foi proposta inicialmente por KOKUBO et al. (1996), que demonstraram que a modificação superficial por meio do tratamento alcalino com NaOH promove aumento da rugosidade superficial, além de

apresentar outras características favoráveis à deposição de matriz óssea, como maior molhabilidade, hidrofílicidade e energia livre de superfície (YAMAGUCHI et al., 2017). Estudos *in vitro* demonstraram que tais superfícies melhoraram a adesão, o espraiamento de osteoblastos, e alto níveis de biocompatibilidade entre o biomaterial e as células osteoblasticas (MIAO et al., 2017; ANSAR et al., 2019), enquanto em estudo *in vivo* demonstrou-se melhor embriamento mecânico e formação de matriz mineralizada ao redor de implantes tratados com solução alcalina de NaOH (LIDDELL et al., 2020).

Assim, frente aos resultados adversos da instalação de implantes osseointegrados em pacientes em uso de BF e aos resultados promissores desta modificação de superfície, esta poderia ser uma alternativa interessante para melhorar a resposta do tecido ósseo à para este grupo de pacientes.

## **2 – PROPOSIÇÃO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o metabolismo de osteoblastos humanos tratados ou não com o ácido zoledrônico (AZ) sobre as superfícies de titânio polidas e submetidas à modificação de superfície por meio de imersão hidrotérmica em solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH).

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento por imersão hidrotérmica em solução de hidróxido de sódio na rugosidade dos discos de titânio, por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal.

- Avaliar a influência da modificação da superfície de titânio por imersão hidrotérmica em solução de hidróxido de sódio no metabolismo e diferenciação de osteoblastos humanos após contato com ácido zoledrônico, por meio da avaliação da viabilidade celular, síntese de colágeno, produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e deposição de nódulos de mineralização.

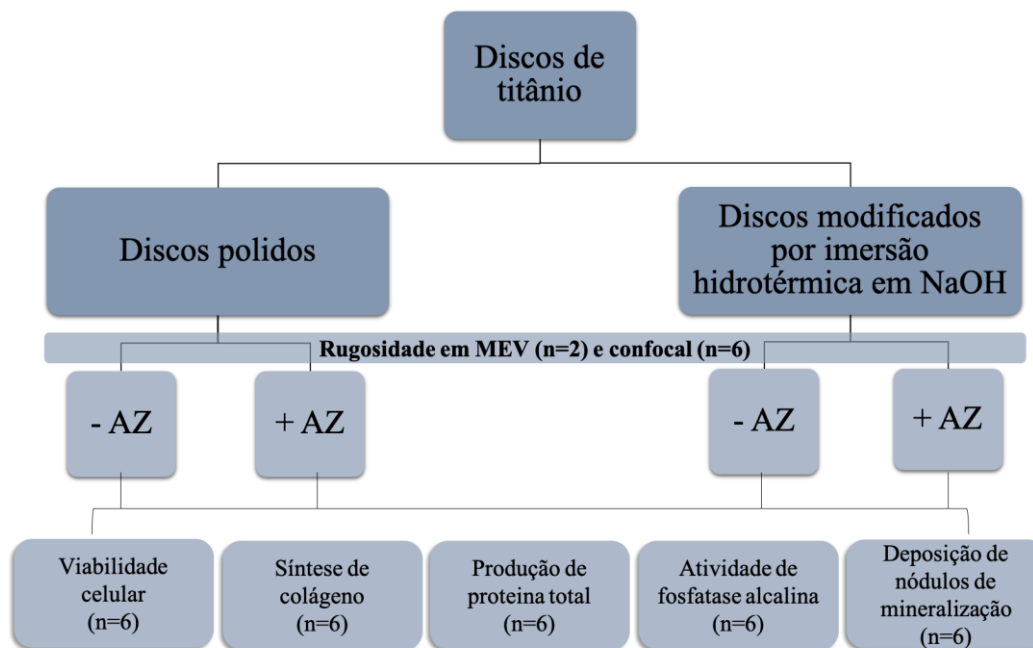
### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado utilizando modelo de cultura de células sobre discos de titânio, para simular o comportamento das células do tecido ósseo quando em contato com as superfícies dos parafusos de implantes orais. Os fatores do estudo foram: superfícies de titânio, polidas ou submetidas a modificação de superfície por imersão hidrotérmica em hidróxido de sódio (NaOH), e presença ou ausência de ácido zoledrônico (AZ). As variáveis respostas incluíram avaliação da rugosidade superficial, viabilidade celular, síntese de colágeno, produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e deposição de nódulos de mineralização.

A distribuição dos grupos está apresentada na Figura 3.

**Figura 3.** Fluxograma representativo da distribuição dos grupos experimentais.



Fonte: Autor

### 3.2 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO

Os discos de titânio foram obtidos a partir de barra de titânio comercialmente puro, submetida a usinagem em discos de 13 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura. Todos os discos foram lixados manualmente com lixas d'água de granulações de 400, 600 e 1200, sob umidade em água deionizada, em movimentos padronizados em forma de  $\infty$ , para obtenção de rugosidade superficial padronizada. Anteriormente ao cultivo celular, os discos foram avaliados quanto a rugosidade superficial em microscópio confocal em (OLYMPUS LEXT OLS4000, Shinjuku, Toko, Japão) (Figura 4).

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, os discos foram submetidos a limpeza em cuba de ultrassom (50 Hz), de acordo com o seguinte protocolo:

1. Imersão por 30 min em acetona;
2. Imersão por 30 min em água deionizada;
3. Imersão por 30 min em etanol 100%;
4. Imersão por 30 min em água deionizada;

Após limpeza, os discos foram esterilizados em autoclave (YAMAGUCHI et al., 2019).

Figura 4. Esquema representativo do preparo dos discos de titânio

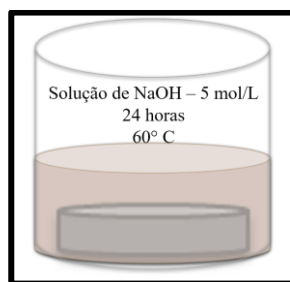


Fonte: autor

### 3.3 TRATAMENTO TÉRMICO ALCALINO

A modificação de superfície foi realizada a partir do tratamento térmico alcalino, por meio de imersão dos discos de titânio em solução de NaOH na concentração de 5 mol/L em água deionizada estéril, por 24 horas, a 60 °C, sob agitação a 600 rpm. Após este período, os discos foram submetidos a lavagem com água deionizada estéril. Tal protocolo foi aplicado, seguindo estudos previamente realizados na área (KAWAI et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5. Figura representativa do processo de modificação de superfície dos discos de titânio.



Fonte: autor

### 3.4 ANÁLISE QUALITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

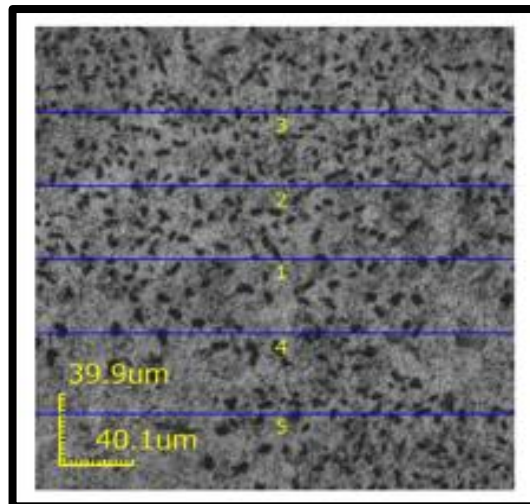
A topografia das amostras de titânio submetidas ou não à modificação de superfície foi avaliada por meio de microscopia confocal, conforme descrito no item anterior e por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, 2 amostras de cada grupo foram recobertas em ouro analisada em microscópio eletrônico de varredura em aumento de 5.000 vezes (Inspect Scanning Electron Microscope - S50; FEI, Hillsboro, OR, EUA) do Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### 3.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

Após os tratamentos, seis amostras de cada grupo de discos, polidos e submetidos ao tratamento alcalino, foram avaliadas quanto a sua rugosidade superficial, utilizando o microscópio confocal de materiais (OLYMPUS LEXT OLS4000), em aumento de 1024 vezes, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para esta análise, foi determinada a rugosidade superficial de cinco regiões lineares distintas de cada disco, sendo considerada como a sua rugosidade superficial final a média aritmética destas medidas (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da análise da rugosidade superficial dos discos de titânio



Fonte: autor

### 3.6 CULTURA DE OSTEOLASTOS HUMANOS

Foi utilizada a linhagem osteoblástica humana Saos-2 (American Types of Cell Culture – ATCC # HTB85). Estas células foram mantidas em meio de cultura Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM – Gibco, Carlsbad, CA, EUA), contendo solução antibiótica (PenStrep 1% - Gibco) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, Carlsbad, CA, EUA) (BASSO et al., 2014).

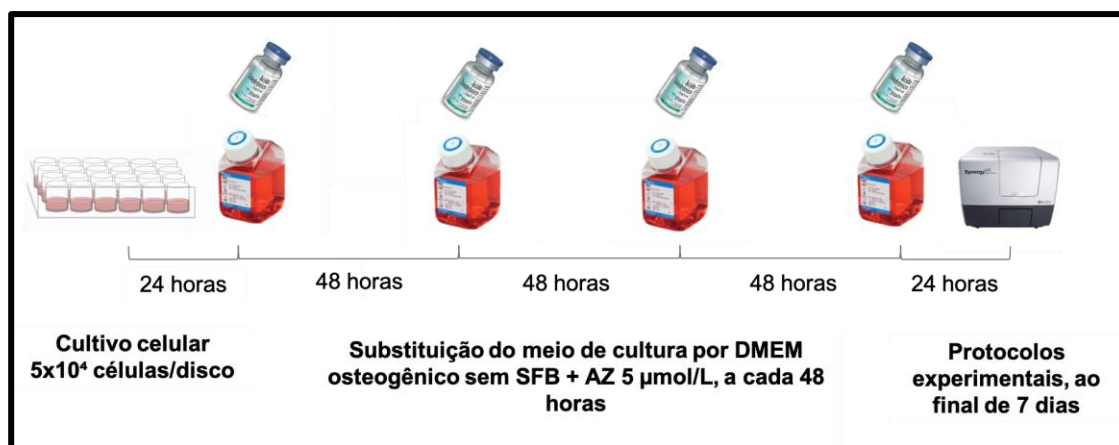
Para o experimento, os discos de titânio foram posicionados em placas de cultura de células de 24 compartimentos, seguido da adição de meio de cultura DMEM completo, contendo 10% de SFB e solução antibiótica. As células foram cultivadas sobre os discos de titânio ( $5 \times 10^4$  células/disco), utilizando DMEM completo e estas foram submetidas a incubação nas condições de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.7 TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO (AZ)

Após 24 horas do cultivo celular, para os grupos a serem tratados com AZ, o meio de cultura foi substituído por DMEM livre de SFB, contendo betaglicerofosfato 10 mmol/L (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e ácido ascórbico 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) (meio osteogênico). A este novo meio foi adicionado o bisfosfonato, na concentração de 5 µmol/L. As células foram mantidas em contato com o medicamento por 7

dias. O meio de cultura foi substituído a cada 48 horas, com reaplicação do bisfosfonato (Figura 7). Os grupos experimentais estão apresentados na Tabela II.

Figura 7. Esquema representativo das etapas experimentais



Fonte: autor

Tabela II. Distribuição dos grupos experimentais a partir dos tratamentos propostos

<b>Grupos experimentais</b>	<b>-AZ</b>	<b>+ AZ(5 <math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
Discos polidos (Polidos)	-	+
Discos com modificação de superfície (NaOH)	-	+

Fonte: autor

### 3.8 ANALISE DA VIABILIDADE CELULAR

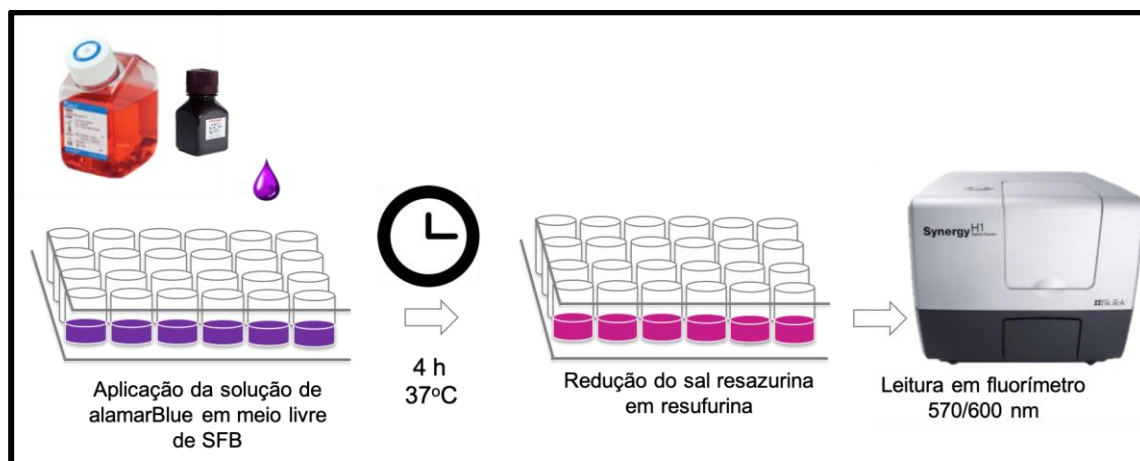
A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), baseado na redução do sal resazurina em um indicador fluorescente, a resufurina, por enzimas mitocondriais. Sendo assim, a intensidade de fluorescência da solução resultante é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, que, por sua vez, reflete a população de células viáveis de cada amostra (RAMBERSAD et al., 2012).

Após os tratamentos propostos, as células foram incubadas com solução composta por meio de cultura DMEM livre de SFB contendo 10% da solução de alamarBlue, a  $37^\circ\text{C}$  por 4 horas. Após este período, três alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) sendo a seguir



determinada a taxa de fluorescência da solução, por meio de fluorímetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA), nos comprimentos de onda de (570/600 nm) (CARDOSO et al., 2020) (Figura 8).

Figura 8. Esquema representativo da análise da viabilidade celular por meio do ensaio de alamarBlue

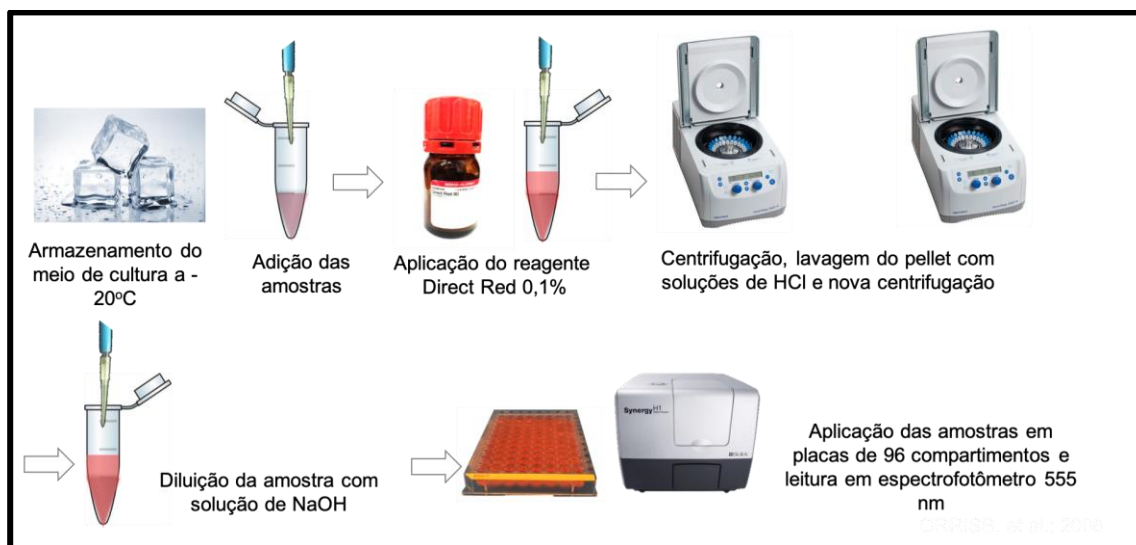


Fonte: autor

### 3.9 SÍNTESE DE COLÁGENO

A síntese de colágeno foi determinada por meio do ensaio Sirius Red (BASSO et al., 2018). Para esta análise, o meio de cultura em contato com as células foi coletado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do teste. Foram utilizados  $200\ \mu\text{L}$  do meio de cultura, que foram adicionados a um tubo contendo  $200\ \mu\text{L}$  do reagente Direct Red 0,1% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Esta solução foi então incubada sob agitação por 1 hora (400 rpm - Thermomixer – Eppendorf, Hamburg, Alemanha), a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a  $10^4$  rpm por 10 min (Microcentrifugal 5415R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha), sendo obtido um *pellet*, que foi lavado em solução de ácido clorídrico ( $0,1\ \text{mol/L}$ ) e submetido a nova centrifugação, nos mesmos parâmetros. Por fim, o *pellet* foi solubilizado em solução de hidróxido de sódio ( $0,5\ \text{mol/L}$ ). Três aliquotas de  $100\ \mu\text{L}$  de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e avaliadas por meio de espectrofotômetro a  $555\text{nm}$  (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA) (Figura 9).

Figura 9. Esquema representativo da análise da síntese de colágeno pelos osteoblastos

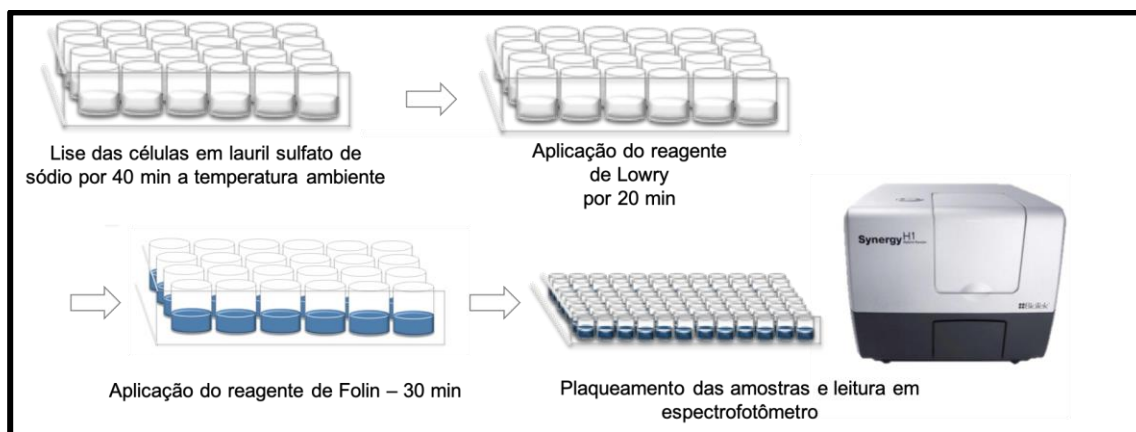


Fonte: autor

### 3.10 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Para determinar a produção de proteína total dos osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio, previamente à realização do teste, os discos foram realocados em novas placas de cultura. Como etapa inicial, as células foram lisadas em 1 mL lauril sulfato de sódio 0,1% a temperatura ambiente (25°C), por 40 min. A seguir, foi adicionado 1 mL da solução de Lowry, seguido de incubação por 20 minutos. Por fim, foi adicional 0,5 mL do reagente Folin & Ciocalteu's Phenol, previamente diluído em água deionizada (1:5). Após incubação por 30 min em ausência de luz, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e as amostras foram submetidas a avaliação em espectrofotômetro, a 655 nm (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA) (SILVA LEITE et al., 2017). A concentração de proteína total foi determinada a partir de curva padrão contendo concentrações previamente estabelecidas de albumina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) (Figura 10).

Figura 10. Esquema representativo da análise da síntese de proteína total



Fonte: autor

### 3.11 ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

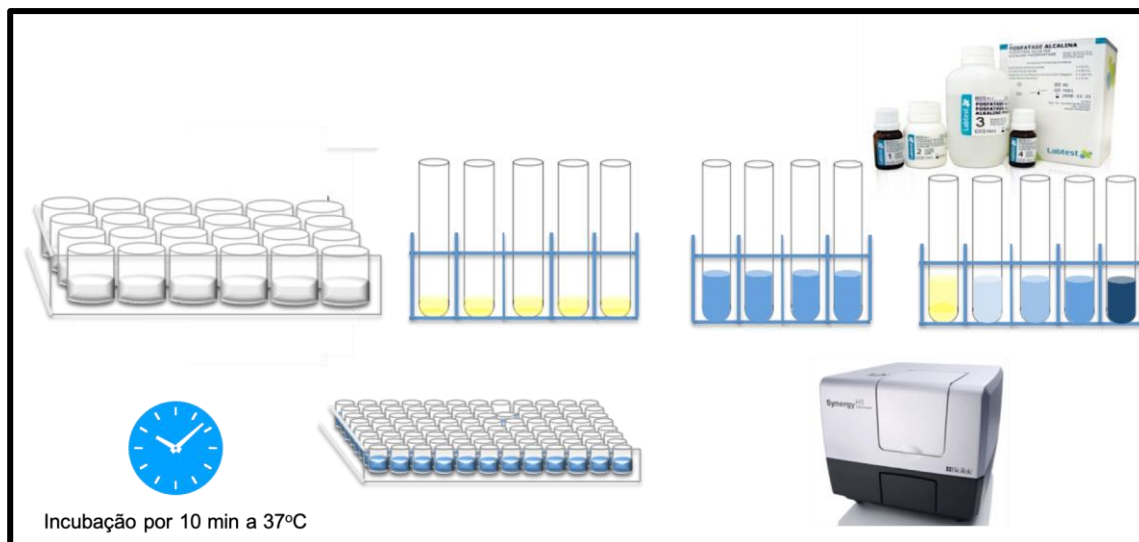
A atividade de fosfatase alcalina foi determinada seguindo um ensaio de ponto final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) (BASSO et al., 2014). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH, promovendo a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente. Para esta avaliação, foi utilizado o produto da lise celular obtido durante a análise da produção de proteína total, conforme citado no item 3.10.

A reação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante, utilizado 50  $\mu$ L de cada amostra, seguido de incubação a 37°C por 10 min. Após este período, foram acrescentados 2 mL de reagente colorimétrico (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente). Após verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100  $\mu$ L de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA).

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 590 nm. A atividade de fosfatase alcalina foi calculada utilizando uma curva padrão com valores pré-determinados da enzima, estabelecidos a partir do reagente padrão fornecido pelo kit. Os

resultados da atividade de ALP foram normalizados pela produção de proteína total de cada amostra (Figura 11).

Figura 11. Esquema representativo da análise da atividade de ALP



Fonte: autor

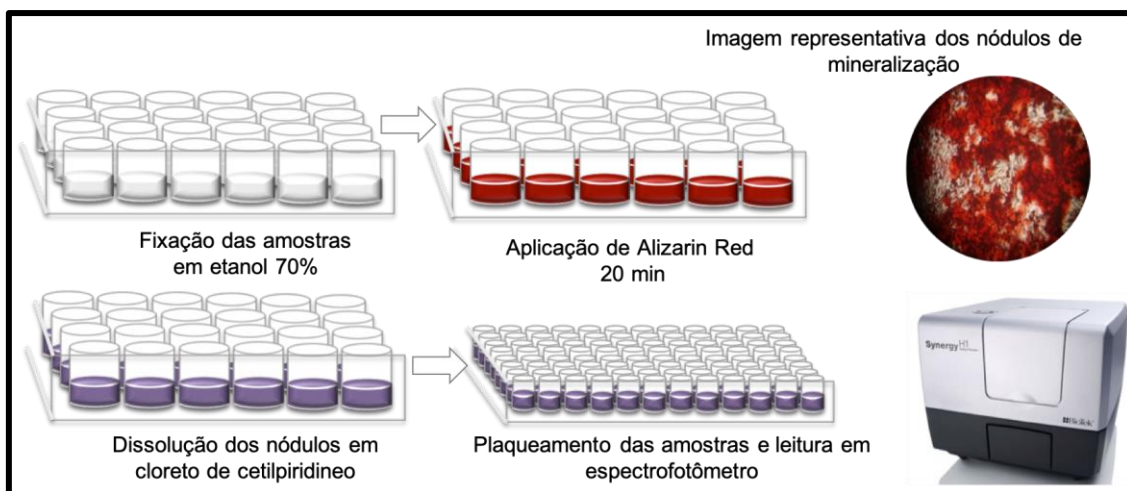
### 3.12 DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

Para avaliar a deposição de nódulos de mineralização sobre os discos de titânio, após os tratamentos propostos, os discos foram transferidos para novas placas de cultura de 24 compartimentos e, então, as células foram fixadas em etanol 70%, por 1 h. A formação dos nódulos de mineralização foi observada através do Teste de Alizarin Red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), como descrito:

Após a fixação, as células foram lavadas com água deionizada, por 5 min. A seguir, foi adicionada a solução de Alizarin Red (40 mmol/L; pH 4,2) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), por 20 min, sob agitação. As amostras foram então lavadas duas vezes com água deionizada por 5 min. Com o objetivo de analisar quantitativamente a formação dos nódulos, as amostras foram solubilizadas em 1 mL de cloreto de cetilpiridíneo a 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), por 15 min, sob agitação.

Após verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100  $\mu$ L de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), seguido de análise da absorbância a 562nm em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader – Biotek, Winooski, VT, EUA) (BASSO et al., 2014) (Figura 12).

Figura 12. Esquema representativo da deposição de nódulos de mineralização



Fonte: autor

### 3.13 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados de rugosidade superficial obtidos por meio de MEV foram analisados descritivamente, enquanto os resultados quantitativos de rugosidade superficial foram submetidos ao teste t-Student.

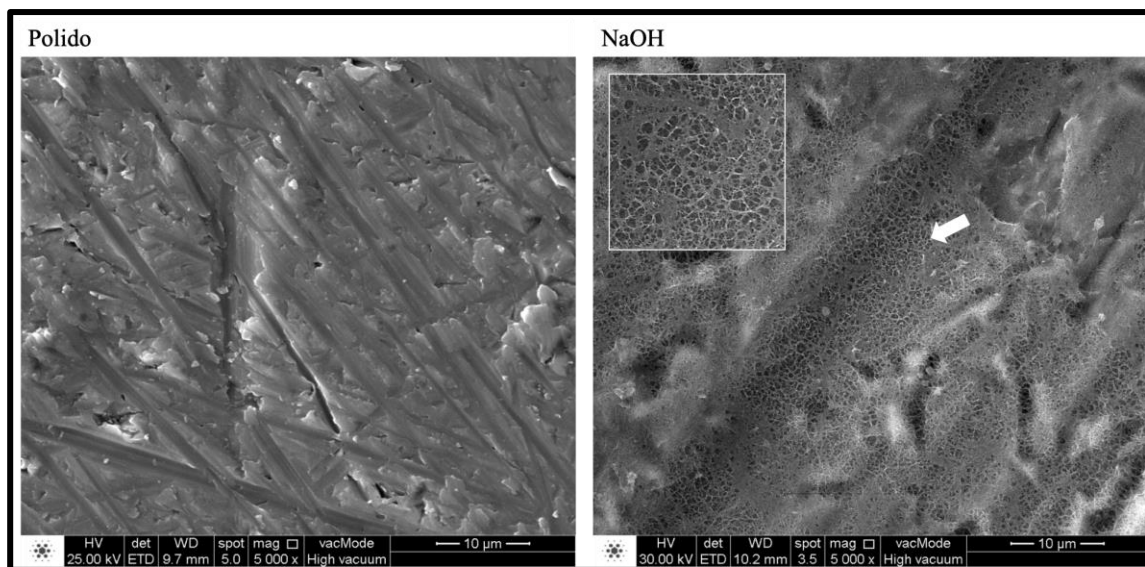
Os resultados de viabilidade celular (n=6), síntese de colágeno (n=6), produção de proteína total (n=6), atividade de ALP (n=6) e deposição de nódulos de mineralização (n=6) estão apresentados em forma de porcentagem, sendo o grupo de osteoblastos cultivados em discos polidos, na ausência de AZ considerado como 100% para cada variável. Estes dados foram submetidos a análise de homogeneidade e distribuição (Shapiro-Wilk). Sendo observada distribuição normal, estes foram analisados estatisticamente por meio do teste de ANOVA a dois critérios e pós-teste de Tukey. Todas as inferências estatísticas foram realizadas considerando nível de significância de 5%. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

As eletromicrografias da análise em MEV demonstram que as amostras submetidas à modificação de superfície com NaOH apresentam alterações de topografia, com a formação de microporosidades (Figura 13).

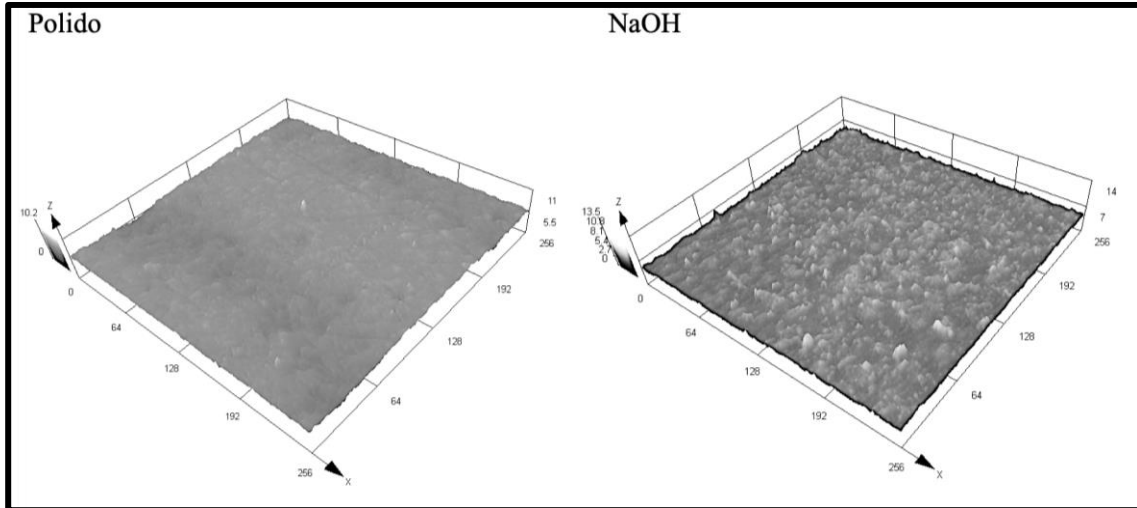
Figura 13. Eletromicrografias da análise dos discos de titânio polidos e submetidos a modificação superficial com NaOH por meio de MEV. Imagens representativas dos grupos obtidas em MEV, no aumento de 5.000x. A seta evidencia a formação de microporosidades no grupo submetido ao tratamento com NaOH. Em detalhe, observa-se as microporosidades em aumento de 15.000x.



Fonte: autor

A partir da análise dos discos em microscópio confocal, nota-se aumento da rugosidade superficial para os discos submetidos a modificação de superfície, sendo que esta apresenta maiores irregularidades (picos e vales) quando comparadas aos discos polidos (Figura 14).

Figura 14. Análise da rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH por meio de microscópio confocal. Imagem representativa da análise da rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, demonstrando as diferentes topografias para cada grupo, por meio de microscópio confocal (x1024x).

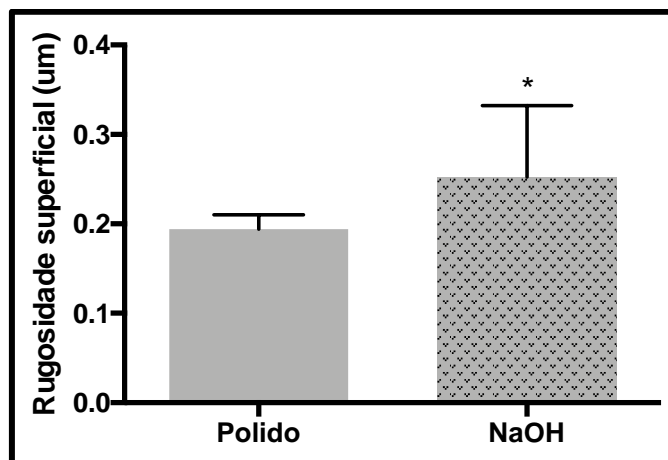


Fonte: autor

#### 4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A avaliação quantitativa da rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH demonstra que o segundo grupo apresentou aumento significativo desta rugosidade ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

Figura 15. Rugosidade superficial dos discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH por meio de microscópio confocal. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (t-Student,  $p < 0,05$ ).

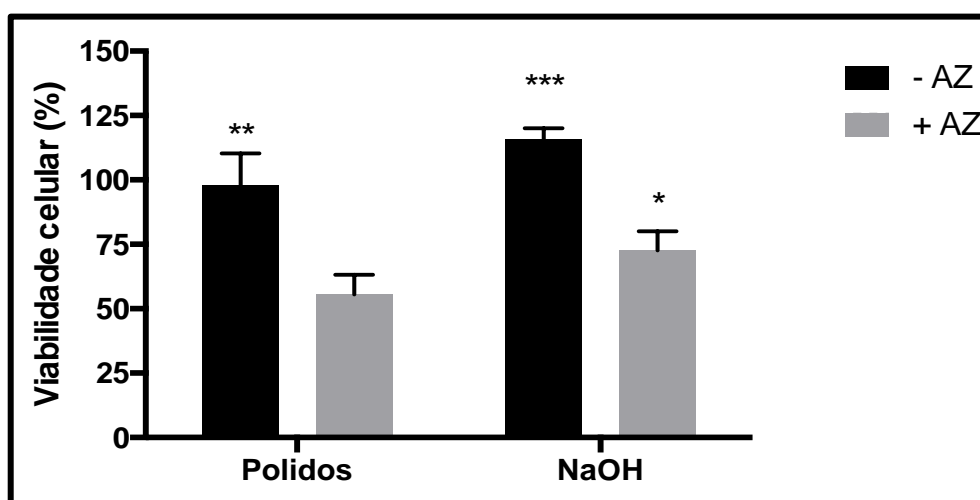


Fonte: autor

### 4.3 VIABILIDADE CELULAR

Os osteoblastos cultivados sobre superfícies dos discos de titânio modificadas com NaOH apresentaram maior viabilidade quando comparados às células cultivadas sobre os discos polidos, na presença ou ausência do AZ ( $p < 0,05$ ). As células tratadas com AZ apresentaram redução da viabilidade para os dois tipos de superfície, polida ou modificada com NaOH, sendo que quando estas foram semeadas sobre os discos submetidos a modificação de superfície, maior viabilidade celular foi observada ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

Figura 16. Viabilidade dos osteoblastos cultivados sobre os discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, tratados ou não com AZ. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA two-way/Tukey,  $p < 0,05$ ).



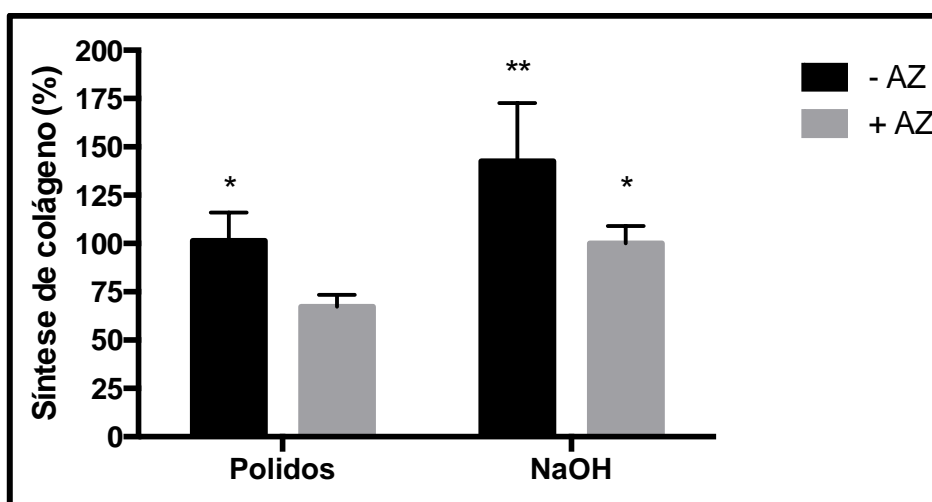
Fonte: autor

### 4.4 SÍNTESE DE COLÁGENO

A síntese de colágeno foi maior para os osteoblastos cultivados sobre discos de titânio submetidos a modificação de superfície com NaOH quando comparados às células cultivadas sobre os discos polidos, tanto na ausência quanto na presença de AZ ( $p < 0,05$ ). O tratamento das células com AZ resultou em queda significativa da síntese desta proteína para ambos os grupos de discos, polidos ou submetidos a modificação com NaOH ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).



Figura 17. Síntese de colágeno por osteoblastos cultivados sobre os discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, tratados ou não com AZ. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significante (ANOVA two-way / Tukey,  $p < 0,05$ ).

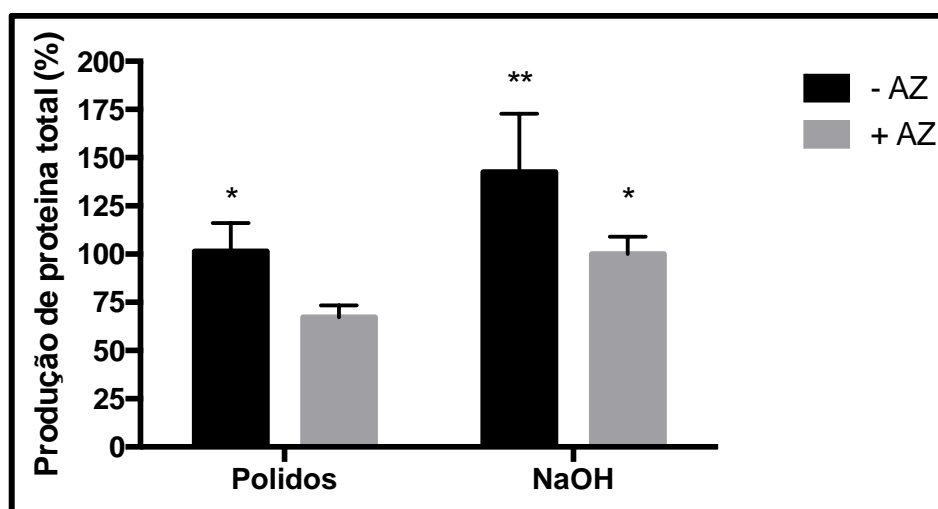


Fonte: autor

#### 4.5 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Os osteoblastos apresentaram maior produção de proteína total quando foram cultivados sobre os discos submetidos a modificação de superfície, independente da presença do AZ ( $p < 0,05$ ). Na presença do medicamento, houve maior produção de proteína total para as células cultivadas sobre os discos submetidos ao tratamento quando comparados aos osteoblastos tratados com AZ sobre os discos polidos ( $p < 0,05$ ). As células cultivadas sobre discos polidos tratadas com AZ apresentaram redução da produção de proteína total ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).

Figura 18. Produção de proteína total por osteoblastos cultivados sobre os discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, tratados ou não com AZ. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA two-way / Tukey,  $p < 0,05$ ).

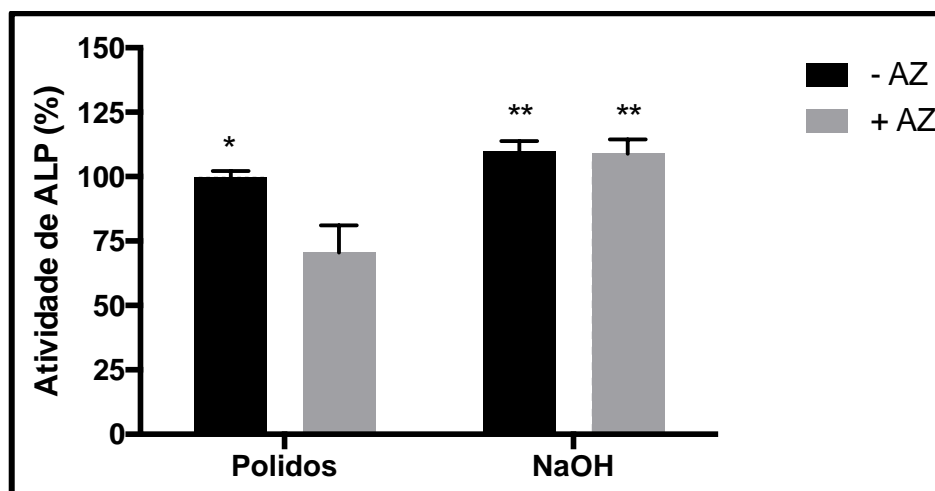


Fonte: autor

#### 4.6 ATIVIDADE DE ALP

A atividade de ALP foi maior para as células cultivadas sobre os discos submetidos a modificação de superfície, tanto na ausência, como na presença do AZ ( $p < 0,05$ ). As células expostas ao AZ cultivadas sobre discos polidos apresentaram redução da atividade desta enzima quando comparados aos discos não expostos e também àqueles expostos ao AZ mas com células cultivadas sobre discos submetidos a modificação de superfície com NaOH ( $p < 0,05$ ). A presença do AZ não interferiu na atividade de ALP pelos osteoblastos cultivados sobre a superfície modificada ( $p > 0,05$ ) (Figura 19).

Figura 19. Atividade de ALP por osteoblastos cultivados sobre os discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, tratados ou não com AZ. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA two-way / Tukey,  $p < 0,05$ ).

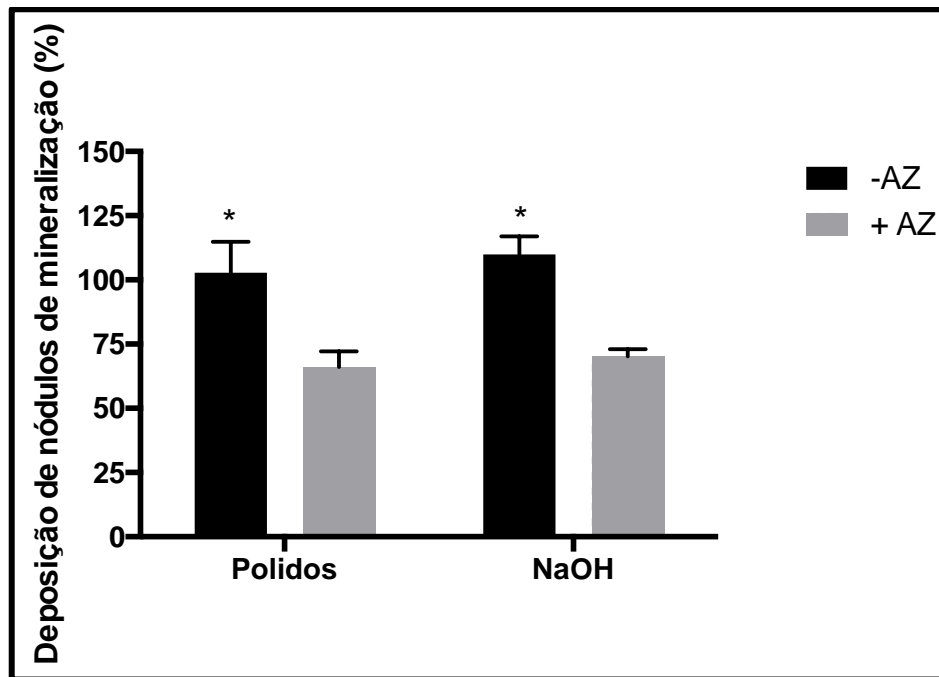


Fonte: autor

#### 4.7 DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

A deposição de nódulos de mineralização foi estatisticamente semelhante para as células cultivadas sobre discos polidos e submetidos a modificação de superfície, seguidos os parâmetros de presença ou ausência do AZ ( $p < 0,05$ ). Podendo-se compreender que o efeito deletério do AZ sobre a mineralização ocorreu independentemente do tratamento superficial com NaOH ( $p < 0,05$ ). A modificação de superfície não interferiu na deposição de nódulos pelos osteoblastos tratados com AZ ( $p > 0,05$ ) (Figura 20).

Figura 20. Deposição de nódulos de mineralização por osteoblastos cultivados sobre os discos polidos e submetidos a modificação de superfície com NaOH, tratados ou não com AZ. Barras indicam média e desvio-padrão. Grupos identificados por símbolos diferentes apresentam diferença estatisticamente significante (ANOVA two-way / Tukey,  $p < 0,05$ ).



Fonte: autor

## 5 – DISCUSSÃO

Tendo em vista o objetivo deste estudo, determinar a influência da modificação de superfície de titânio com solução de NaOH nas funções osteoblásticas relacionadas à osseointegração na presença do AZ, produziu resultados positivos. Esta modificação pareceu fornecer substrato favorável a adesão celular, visto que maior viabilidade foi observada para os osteoblastos cultivados sobre a superfície submetida a ação alcalina, mesmo na presença do AZ. De forma semelhante, a síntese de proteína total e de colágeno também foi maior para este grupo, assim como a atividade de ALP. Estes resultados parecem estar relacionados a topografia superficial, uma vez que a rugosidade proporcionada pela ação hidrotérmica da solução de NaOH, oportuniza melhor adesão das células a superfície e proporciona aumento da sobrevivência celular.

A modificação de superfície proporciona ao implante um aumento da rugosidade superficial, de forma a aumentar a superfície de contato deste material com o tecido ósseo, melhorando seu imbricamento (SANTOS et al., 2011). O presente trabalho demonstrou que a modificação superficial de discos de titânio com tratamento hidrotérmico em NaOH a 60 °C e concentração de 5 mol/L, resultou em alteração superficial significativa, com a presença de microrrugosidades, observadas por meio de análise em MEV e microscopia confocal, assim como previamente demonstrado por outros autores (KOKUBO et al., 1996; KOKUBO et al., 2004; XING et al., 2014; YAMAGUCHI et al., 2015). XING et al. (2014) demonstrou que superfícies de titânio submetidas a modificação com soluções de NaOH em diferentes concentrações apresentaram maior hidrofiliabilidade, molhabilidade e energia livre de superfície, o que favorece a adesão e o espraiamento celular.

Alterações superficiais produzidas sobre os implantes de titânio podem induzir a adesão dos osteoblastos, bem como promovem maior diferenciação destas células (BABUSKA et al., 2016). DEGASNE et al. (1999) de forma semelhante apresentaram maior adesão e proliferação de células da linhagem osteoblástica Saos-2 em implantes com maior rugosidade superficial. Corroborando esses dados, no presente estudo estas células apresentaram aumento de metabolismo, demonstrado por meio do aumento da viabilidade e síntese protéica, bem como maior diferenciação quando cultivados sobre superfícies submetidas ao tratamento hidrotérmico com solução de NaOH, o que pode estar relacionado a maior rugosidade superficial que o biomaterial apresenta (MIAO et al., 2017). XING et al. (2014) igualmente demonstram que células mesenquimais indiferenciadas apresentaram

maior diferenciação osteoblástica quando foram cultivadas em superfícies de titânio tratadas com soluções alcalinas de NaOH.

No presente estudo, os osteoblastos cultivados sobre a superfície submetida ao tratamento alcalino demonstraram maior metabolismo, observado por meio da síntese de proteína total e de colágeno, eventos diretamente relacionados ao processo de reparo dos implantes orais osseointegrados (ALLA et al., 2011). Assim, estes resultados estão de acordo com a literatura, denotando ao tratamento superficial com solução alcalina resultados positivos quanto a aceleração do reparo do tecido ósseo (XUE et al., 2005; KAWAI et al., 2015).

Estudos anteriores confirmaram o aumento da expressão gênica, síntese proteica e atividade de ALP quando osteoblastos foram cultivados em superfícies de elevada rugosidade (XING et al., 2014; MIAO et al., 2017); estes autores sugerem que a alteração da topografia superficial induz maior espriamento das células mesenquimais, o que favorece seu fenótipo osteoblástico. Este estudo também avaliou, o efeito da modificação de superfície na diferenciação dos osteoblastos, por meio da atividade de ALP, demonstrando que as células cultivadas sobre as superfícies modificadas apresentaram aumento significativo da atividade desta enzima.

A deposição dos nódulos de mineralização, evento considerado como marcador de diferenciação celular, não apresentou diferença estatística significativa entre as células cultivadas sobre superfícies polidas ou submetidas a modificação de superfície. Este resultado provavelmente está relacionado ao tempo selecionado para a análise, 7 dias (ALAMI et al., 2016). Outros autores demonstraram efeitos positivos da modificação desta superfície na deposição de nódulos de mineralização, porém, utilizando períodos mais tardios, de 14 dias (MIAO et al., 2017) para osteoblastos, ou ainda de 21 dias, para células indiferenciadas (XING et al., 2014). O período de avaliação foi selecionado a partir de estudos prévios, que demonstraram intensa toxicidade do AZ, bisfosfonato avaliado neste estudo, a partir deste período, inviabilizando avaliações mais prolongadas neste modelo de estudo (ORRISS et al., 2008; BASSO et al., 2013a, BASSO et al., 2013b; BASSO et al., 2014).

O efeito adverso dos bisfosfonatos sobre osteoblastos foi previamente demonstrado pela literatura onde em estudos anteriores, estas células, quando em contato com estes medicamentos, especificamente com AZ, apresentam alterações morfológicas, diminuição da viabilidade e da síntese proteica, além de redução da capacidade de diferenciação, demonstrada pela diminuição da expressão de ALP, além de redução da atividade desta

enzima, e redução da capacidade de mineralização (ORRISS et al., 2008; BASSO et al., 2013a, BASSO et al., 2013b; BASSO et al., 2014).

Os resultados deste estudo corroboram os previamente apresentados, visto que as células da linhagem de osteoblástica Saos-2, na presença do AZ, demonstraram redução da viabilidade celular, da síntese de proteína total e de colágeno, da atividade da ALP, e a diminuição da deposição de nódulos mineralizados. Estudos *in vivo* igualmente comprovam que, na presença do AZ na concentração avaliada, menor produção da matriz mineralizada foi observada (PATNTIRAPONG et al., 2012; OH et al., 2017). Estes resultados em conjunto podem refletir os efeitos adversos observados quando da instalação de implantes osseointegrados em pacientes que estão sob tratamento com AZ e que podem apresentar a liberação deste medicamento na fase inflamatória do reparo ósseo, devido a demanda de renovação óssea. (FREITAS et al., 2016; OH, et al., 2016).

Considerando as limitações para a instalação de implantes osseointegrados em pacientes em uso de BF, principalmente de AZ, a modificação alcalina da superfície de titânio com tratamento hidrotérmico com solução de NaOH parece ser uma alternativa promissora para melhorar a resposta da instalação dos implantes para estes pacientes, tendo em vista a possibilidade de falhas na remodelação óssea e osseointegração. Esta modificação demonstrou ser uma estratégia positiva no aumento da rugosidade da superfície do titânio, bem como na indução do metabolismo dos osteoblastos, mesmo na presença do medicamento. Considerando as limitações deste estudo *in vitro*, novos estudos serão necessários para encontrar o melhor protocolo de modificação da superfície do implante, para que este possa ser considerado como opção no tratamento reabilitador.

## 6 – CONCLUSÃO

Diante da metodologia utilizada e com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

1 – A modificação alcalina da superfície de titânio por meio de imersão hidrotérmica em solução de hidróxido de sódio promoveu aumento da rugosidade com formação de microporosidades.

2 – Os osteoblastos humanos apresentaram aumento de metabolismo, demonstrado por meio do aumento da viabilidade celular, síntese de colágeno e de produção de proteína total, e diferenciação, demonstrada pela atividade de ALP, quando cultivados sobre discos submetidos a modificação alcalina de superfície por meio da imersão hidrotérmica em solução de hidróxido de sódio.

3- O ácido zoledrônico interferiu negativamente no metabolismo e na diferenciação dos osteoblastos cultivados sobre discos polidos. Os osteoblastos cultivados sobre os discos de titânio submetidos a modificação de superfície, estas células apresentaram maior metabolismo e capacidade de diferenciação.



## REFERÊNCIAS

- ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P. I.; LINDHE, J.; ERIKSSON, B.; SBORDONE, L. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.15, n. 1, p. 39-52, 1986.
- ALAMI, S. M.; GANGLOFF, S. C.; LAURENT-MAQUIN, D.; WANG, Y.; KERDJOU DJ, H. Concise review: *in vitro* formation of bone-like nodules sheds light on the application of stem cells for bone regeneration. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, p. 1–7, 2016.
- ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P.I.; HANSSON, H.A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthop. Scand.**, v. 52, n. 2, p. 155-170, 1981.
- ALBREKTSSON, T.; ZARB, G.; WORTHINGTON, P., ERIKSSON, A. R. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 1, n. 1, p. 11-25, 1986.
- ALLA, R. K.; GINJUPALLI, K.; UPADHYA, N.; SHAMMAS, M.; RAVI, R. K.; SEKHAR, R. Surface roughness of implants: A review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 25, n. 3, p. 112-118, 2011.
- ANSAR, E. B.; RAVIKUMAR, K.; SURESH BABU, S.; FERNANDEZ, F. B.; KOMATH, M.; BASU, B.; HARIKRISHNA VARMA, P. R. Inducing apatite pre-layer on titanium surface through hydrothermal processing for osseointegration. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 105, p. 1-7, 2019.
- ATWOOD, D.A.; COY, W. A. Clinical cephalometric and densitometric study of reduction of residual ridges. *J Prosthet Dent.*, v. 26, n. 3, p. 280–295, 1971.
- BABUSKA, V.; MOZTARZADEH, O.; KUBIKOVA, T.; MOZTARZADEH, A.; HRUSAK, D.; TONAR, Z. Evaluating the osseointegration of nanostructured titanium implants in animal models: Current experimental methods and perspectives (Review). **Biointerphases**, v. 11, n. 3, p. 030801-030801-11, 2016.

BASSO, F. G.; PANSANI, T. N.; OLIVEIRA, C. F. de; TURRIONI, A. P. S.; SOARES, D. G.; HEBLING, J.; COSTA, C. A. de S. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. **Braz. Dental J.**, v. 24, n.6, p. 551–558, 2013.

BASSO, F. G.; SILVEIRA TURRIONI, A. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology**, v. 59, n. 6, p. 534–541, 2013.

BASSO, F. G.; PANSANI, T. N.; SOARES, D. G.; CARDOSO, L. M.; HEBLING, J.; COSTA, C. A. S. Influence of bisphosphonates on the adherence and metabolism of epithelial cells and gingival fibroblasts to titanium surfaces. **Clinical Oral Investigations**, v.22:893, p. 893–900, 2018.

BASSO, F. G.; TURRIONI, A. P. S.; SOARES, D. G.; BAGNATO, V. S.; HEBLING, J.; de SOUZA COSTA, C. A. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. **Supportive Care in Cancer**, v. 22, n. 10, p. 2741–2748, 2014.

BODY, J. J.; MANCINI, I. Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when? **Support Care Cancer**, v. 10, p. 399–407, 2002.

BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, B. O. ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.**, v. 16, p. 1-132, 1977.

CARDOSO, L. M.; PANSANI, T. N.; HEBLING, J.; COSTA, C A S.; BASSO, F. G. Photobiomodulation of inflammatory-cytokine-related effects in a 3-D culture model with gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.**, p. 1-8, 2020.

CARRADÒ, A.; PERRIN-SCHMITT, F.; LE, Q. V.; GIRAUDEL, M.; FISCHER, C.; KOENIG, G.; JACOMINE, L.; BEHR, L.; CHALOM, A.; FIETTE, L.; MORLET, A.; POURROY, G. Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteoitegration. **Dent Mater.**, v. 33, p. 321-332, 2017.

CAWOOD, J. I.; HOWELL, R. A. Reconstructive preprosthetic surgery. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 20, n. 2, p. 75-82, 1991.

CHADHA, G.; AHMADIEH, A.; KUMAR, S.; SEDGHIZADEH, P. P. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. **J Oral Implantol.**, v. 39, n. 4, p. 510–520, 2013.

COLEMAN, R. E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. **Cancer Treat Rev.**, v. 27, n. 3, p. 165–176, 2001.

COOPER, L. F. The current and future treatment of edentulism. **J Prosthodont.**, v. 18, p. 116 – 122, 2009.

DE-FREITAS, N. R.; LIMA, L. B.; DE-MOURA, M. B.; VELOSO-GUEDES, C. C.; SIMAMOTO-JÚNIOR, P. C.; MAGALHÃES, D. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 21, n. 5, p. e644-e651, 2016.

DEGASNE, I.; BASLÉ, M.; DEMAIS, V.; HURE´, G.; LESOURD, M.; GROLLEAU, B.; MERCIER, L.; CHAPPARD, D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. **Calcif Tissue Int.**, v. 64, p. 499–507, 1999.

GERZON, A. S.; PERES, C. A.; ROSA, M. B.; FETTER, E. P.; MARCHIONI, L. A. Surfaces in implantology: Characteristics of the main Brazilian implants. **Dental Press Implantol.**, v. 7, n. 4, p. 46-51, 2013.

GUGLIELMOTTI, M. B.; OLMEDO, D. G.; CABRINI, R. L. Research on implants and osseointegration. **Periodontol 2000.**, v. 79, p. 178-189, 2019.

KAMEL, A. A. Phosphorus compounds in pharmaceutical drugs and their rising role as antioxidants and antidiabetics: A review. **International Journal of Chemical and Biomedical Science**, v.1, n. 3, p. 56-69, 2015.

KAWAI, T.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; TANAKA, M.; AKIYAMA, H.; NAKAMURA, T.; MATSUDA, S. Comparison between alkali heat treatment and sprayed

hydroxyapatite coating on thermally-sprayed rough Ti surface in rabbit model: Effects on bone-bonding ability and osteoconductivity. **J. Biomed. Mater. Res., Part B**, v. 103B, n. 5, p. 1069-1081, 2015.

KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. REVIEW Bioactive metals: preparation and properties. **J Mat Scienc: Materials Med.**, v. 15, n. 2, p. 99–107, 2004.

KOKUBO, T.; MIYAJI, F.; KIM, H-M. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 79, n.4, p. 1127-1129, 1996.

KULLAR, A. S.; MILLER, C. S. Are There contraindications for placing dental implants? **Dent. Clin. North Am.**, v. 63, p. 345-362, 2019.

KÜN-DARBOIS, J. D.; LIBOUBAN, H.; MABILLEAU, G.; PASCARETTI-GRIZON, F.; CHAPPARD, D. Bone mineralization and vascularization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an experimental study in the rat. **Clinic Oral Investigat.**, p. 1-10, 2018.

LARSSON, C., THOMSEN, P., ARONSSON, B.-O., RODAHL, M., LAUSMAA, J., KASEMO, B., & ERICSON, L. E. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 605–616, 1996.

LAZAROVICI, T. S.; YAHALOM, R.; TAICHER, S.; SCHWARTZ-ARAD, D.; PELEG, O.; YAROM, N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. **J Oral and Maxillofac Surg.**, v. 68, n. 4, p. 790–796, 2010.

LAWSON, M. A.; XIA, Z.; BARNETT, B. L.; TRIFFITT, J. T.; PHIPPS, R. J.; DUNFORD, J. E.; LOCKLIN, R. M.; EBETINO, F. H.; RUSSELL, R. G. G. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 92, n. 1, p. 149–155, 2010.

LIDDEL, R. S.; LIU, Z-M.; MENDES, V. C.; DAVIES, J. E. Relative contributions of implant hydrophilicity and nanotopography to implant anchorage in bone at early time points. **Clin Oral Impl Res.** v. 31, p. 49-63, 2020.

MADRID, C.; SANZ, M. What impact do systemically administered bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. **Clin Oral Impl Res**; v. 20, p. 87–95, 2009.

MARISCAL-MUÑOZ, E.; COSTA, C. A. S.; TAVARES, H. S.; BIANCHI, J.; HEBLING, J.; MACHADO, J. P. B.; LERNER, U. H.; SOUZA, P. P. C. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. **Clin Oral Invest.** v. 39, n. 3, p. 202-211, 2015.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 61, n. 9, p. 1115–1117, 2003.

MIAO, X.; WANG, D.; XU, L.; WANG, J.; ZENG, D.; LIN, S.; HUANG, C.; LIU, X.; JIANG, X. The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. **Inter J Nanomedic.**, v. 12, p. 1415-1430, 2017.

OH, K. C.; HWANG, W.; PARK, Y. B.; LEE, J. H.; MOON, H. S.; KIM, J. H. Effects of alendronate on bone remodeling around osseointegrated implants in rats. **Implant Dentist.**, v. 26, n. 1, p 46–53, 2017.

OLIVEIRA, D.; HASSUMI, J. S.; GOMES-FERREIRA, P. H. S.; POLO, T. O. B.; FERREIRA, G. R.; FAVERANI, L. P.; OKAMOTO, R. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **J Appl Oral Sci.** v. 25, n. 1, p. 42–52, 2017.

ORRISS, I. R.; KEY, M. L.; COLSTON, K. W.; ARNETT, T. R. Inhibition of osteoblast function *in vitro* by aminobisphosphonates. **J Cell Biochemist.**, v.106, n. 1, p. 109–118; 2009.

OTTO, S.; HAFNER, S.; MAST, G.; TISCHER, T.; VOLKMER, E.; SCHIEKER, M.; STÜRZENBAUM, S. R.; VON TRESCKOW, E.; KOLK, A.; EHRENFELD, M.; PAUTKE, C. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? **J Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 5, p. 1158-1161, 2010.

PACHECO, V. N.; LANGIE, R.; ETGES, A.; PONZONI, D.; PURICELLI, E. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats – a blind randomized controlled trial. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 96, p. 255–260, 2015.

PANSANI, T. N.; BASSO, F. G.; DOS REIS SOUZA, I.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Characterization of titanium surface coated with epidermal growth factor and its effect on human gingival fibroblasts. **Arc. Oral Biology**. v. 102, p. 48-54, 2019.

PATNTIRAPONG, S.; SINGHATANADGIT, W.; CHANRUANGVANIT, C.; LAVANRATTANAKUL, K.; SATRAVAHA, Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. **J Oral Pathol and Med.**, v. 41, p. 713-720, 2012.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**., v.12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RAVOSA, M. J.; NING, J.; LIU, Y.; STACK, M. S. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. **Arch of Oral Biol**, v. 56, p. 491-498, 2011.

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; FANTASIA, J.; GOODDAY, R. AGHALOO, T.; MEHROTRA, B.; O'RYAN, F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, 2014.

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**. v. 49, n. 1, p. 2-19, 2011.

SANTOS, M. V.; ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C. The effects of superficial roughness and design on the primary stability of dental implants. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 13, n. 3, p. 215-223, 2011.

SILVA LEITE, M. L. A.; SOARES, D. G.; BASSO, F. G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Biostimulatory effects of simvastatin on MDPC-23 odontoblast-like cells. **Braz. Oral Res.**, v. 31, p. 1-9, 2017.

TRENTO, G.; DE A. CARVALHO, P. H.; DE C. REIS, E. N. R.; SPIN-NETO, R.; BASSI, A. P. F.; PEREIRA-FILHO, V. A. Bone formation around two titanium implant surfaces placed in bone defects with and without a bone substitute material: A histological, histomorphometric, and micro-computed tomography evaluation. **Clin Implant Dent Relat Res.**, p. 1–9, 2020.

VAN STEENBERGHE, D.; BRÅNEMARK, P. I.; QUIRYNEN, M.; DE MARS, G.; NAERT, I. The rehabilitation of oral defects by osseointegrated implants. **J. Clin Periodontol.**, v.18, n.6, p. 488-493, 1991.

XING, H.; KOMASA, S.; TAGUCHI, Y.; SEKINO, T.; OKAZAKI, J. Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures. **Inter J Nanomed**, v. 9, p. 1741-1755, 2014.

XUE, W.; LIU, X.; ZHENG, X.; DING, C. In vivo evaluation of plasma-spayed titanium coating after álcali modification. **Biomaterial**, v.26, n. 16, p. 3029-3037, 2005.

YAMAGUCHI, S.; NATH, S.; SUGAWARA, Y.; DIVAKARLA, K.; DAS, T.; MANOS, J.; CHRZANOWSKI, W.; MATSUSHITA, T.; KOKUBO, T. Two-in-one biointerfaces-antimicrobial and bioactive nanoporous gallium titanate layers for titanium implants. **Nanomaterials**, v. 7, n. 229, p. 1-17, 2017.

<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/26104-em-2018-expectativa-de-vida-era-de-76-3-anos>