



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biologia Oral)

**Avaliação de uma superfície de implante recoberta por
hidroxiapatita em escala nanométrica associada ao uso de L-
PRF. Estudo *in vivo* em modelo ósseo saudável.**

José Augusto Barbanti Gabarra Júnior

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

José Augusto Barbanti Gabarra Júnior

Avaliação de uma superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica associada ao uso de L-PRF. Estudo *in vivo* em modelo ósseo saudável.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Biologia Oral).

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

RIBEIRÃO PRETO – SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Gabarra Júnior, José Augusto Barbanti.

Avaliação de uma superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica associada ao uso de L-PRF. Estudo *in vivo* em modelo ósseo saudável. / José Augusto Barbanti

Gabarra Júnior; orientador Sérgio Luís Scombatti de Souza. – Ribeirão Preto, 2022.

89 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2022.

1. Implante dentário. 2. Fibrina rica em plaquetas e leucócitos. 3. Hidroxiapatita nanométrica.

GABARRA JUNIOR, J. A. B. Avaliação de uma superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica associada ao uso de L-PRF. Estudo *in vivo* em modelo ósseo saudável. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Biologia Oral).

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a esses cinco cirurgiões dentistas que foram os responsáveis pelos ensinamentos mais relevantes que recebi e por serem minha fonte de inspiração todos os dias buscando ser um profissional de odontologia melhor cuidando de pessoas.

Dr. José Augusto Babanti Gabarra

Dr. Adelcio Santos Gabarra

Dr. Darcy Gabarra

Dra. Maria Silvana Gabarra

Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

“Learning never ends”

Agradecimentos

A produção deste trabalho aconteceu porque algumas pessoas muito importantes estiveram comigo e terão sempre a minha gratidão e carinho por todo o suporte que me foi ofertado.

Agradeço a **Deus** que se faz presente em minha vida e conversa comigo todos os dias.

Aos meus pais **José Augusto** e **Marilene Gabarra**, que me apresentaram e me ofertaram o maior de todos os sentimentos, o Amor.

Aos meus irmãos, **Carla, Paula, Ale e Carol** que junto de mim se transformaram na perpetuação do amor de nossos pais.

A minha **Gaby**, comigo há mais de trinta anos me apoiando e dividindo comigo alegrias e tristezas e sempre confiante que existe um plano de Deus.

As minhas meninas, **Isabella e Beatriz**, vocês são a minha certeza de que o Amor é infinito.

Um agradecimento super especial ao meu orientador, parceiro e amigo **Sérgio Scombatti**. Você é uma das principais referências que tenho na Odontologia. Admiro seu profissionalismo, competência e seu grande dom de ensinar, não apenas a Odontologia, mas também valores de justiça, ética, dedicação e amor naquilo que exerce.

A **Dra. Adriana Maria Mariano Silveira e Souza**, a minha gratidão, carinho e amizade por todo apoio que me ofertou.

Ao **Uislen Cadore**, a você que é um irmão que a vida me apresentou e que desde o início a nossa cumplicidade, parceria e a admiração foram as grandes responsáveis de uma amizade que será para sempre.

Ao **Dr. Rafael Mantovani**, começamos e terminamos tudo isso juntos, sempre atentos que a melhor parte esteve na trajetória e essa faz parte da nossa história.

Ao **Dr. Fernando Nóbrega**, foi um enorme prazer ter dividido com você cada etapa desse processo.

A **Dra. Paula Gabriela Pessôa de Oliveira**, o meu agradecimento por compartilhar seus conhecimentos que me guiaram no início deste projeto.

Ao **Dr. Ytalo Fernandes**, um parceiro sempre disposto a ajudar a qualquer instante.

Uma parte especial do time da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), **Imaculada, Gustavo, Milla, Sebastião e Adriana**, vocês foram muito especiais durante toda essa jornada: “minha gratidão por tudo”.

A todos os **professores e funcionários** do Programa de Mestrado em Biologia Oral, o meu agradecimento por toda a contribuição oferecida.

A **SIN** Implantes pela doação dos materiais necessários para a realização dessa pesquisa. E em especial Dr. Fábio Bezerra e Dra. Bruna Ghiraldini.

Resumo

Resumo

GABARRA JUNIOR, J. A. B. **Avaliação de uma superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica associada ao uso de L-PRF. Estudo *in vivo* em modelo ósseo saudável.** 2022. N° de 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A microestrutura e as características da superfície dos implantes dentários têm influência na resposta óssea. Aumentos na rugosidade da superfície em micro e nano escala levam a um maior contato osso-implante *in vivo* e a melhores taxas clínicas de cicatrização. Estudos anteriores também mostraram que a fibrina rica em plaquetas leucocitárias (L-PRF) contém plaquetas, leucócitos, fatores de crescimento e citocinas, e pode estimular a cicatrização tecidual e a regeneração óssea. Este estudo teve como objetivo avaliar, em ratos, o reparo ósseo ao redor de 2 superfícies de implantes, associado ou não a L-PRF, analisando microtomografia (Contato osso-implante = IS/TS (%); Fração de volume ósseo = BV/TV (%); Superfície óssea/volume ósseo = BS/BV (%); Número Trabecular = Tb.N; Separação Trabecular = Tb.Sp (mm); Espessura trabecular (Tb.Th, mm); Porosidade Total = To.Po (%) e histomorfométrico (Contato osso-implante = BIC; e fração de área óssea Parâmetros de ocupação – BAFO). Mini implantes foram instalados nas tíbias de ratas saudáveis, com 2 tipos de tratamento de superfície (duplo ataque ácido=DAE, ou com adição de nano-hidroxiapatita = NHA; 24 implantes de cada tipo). Em 24 ratos, L-PRF foi obtido com coleta de sangue por meio de punção cardíaca e posterior centrifugação, e inserido no local do osso preparado antes da instalação do implante. Os 48 ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 12 ratos cada: G1 - Implantes de NHA instalados; G2 - Implantes de NHA instalados em associação ao L-PRF; G3 – Implantes DAE instalados; G4 - Implantes DAE instalados em associação ao L-PRF. Os implantes foram projetados para o estudo, medindo 2,7mm de comprimento x 1,4mm de diâmetro, e possuíam a mesma macroestrutura. Os animais foram eutanasiados 7 e 30 dias (7d e 30d) após a colocação dos implantes (6 de cada grupo/período). As tíbias foram removidas para avaliação microtomográfica do osso entre as roscas dos implantes, analisando os parâmetros descritos anteriormente. A análise microtomográfica mostrou que a superfície do implante NHA apresentou mais contato tridimensional osso-

implante, fração de volume ósseo, fração de superfície óssea/volume de tecido, maior número de trabéculas ósseas, além de menor porosidade e separação trabecular, quando comparada à superfície DAE. Além disso, esses resultados foram mais evidentes quando a superfície do NHA foi associada ao L-PRF e no período de avaliação de 30 dias. A avaliação histomorfométrica mostrou que a superfície NHA apresentou maior BAFO quando comparada ao DAE, com ou sem associação ao L-PRF. A superfície NHA também foi a mais beneficiada pela associação ao tratamento com L-PRF.

Palavras-Chave: Implante dentário, Fibrina rica em plaquetas e leucócitos, Hidroxiapatita nanométrica.

Abstract

GABARRA JUNIOR, J. A. B. Evaluation of an implant surface coated with hydroxyapatite at the nanometer scale associated with the use of L-PRF. In vivo study in a healthy bone model. 2022. Nº 89 f. Dissertation (Master's) College of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The microstructure and surface characteristics of dental implants have influence on bone response. Increases in surface micro- and submicro-scale roughness lead to higher bone-to-implant contact *in vivo*, and improved clinical rates of wound healing. Previous studies have also shown that Leukocyte platelet rich fibrin (L-PRF) contains platelets, leukocytes, growth factors and cytokines, and can stimulates tissue healing and bone regeneration. This study aimed to evaluate, in rats, the bone repair around 2 implant surfaces, associated or not to L-PRF, analyzing microtomographic (Bone to Implant Contact = IS/TS,%; Bone Volume Fraction = BV/TV, %; Bone Surface/Bone Volume = BS/BV, %; Trabecular Number = Tb.N; Trabecular Separation = Tb.Sp, mm; trabecular thickness (Tb.Th, mm); Total Porosity = To.Po, %) and histomorphometric (Bone to Implant Contact = BIC; and Bone Area Fraction Occupancy – BAFO) parameters. Mini implants were installed in the tibias of healthy female rats, with 2 types of surface treatment (double acid etched=DAE, or with the addition of nano-hydroxyapatite = NHA; 24 implants of each type). In 24 rats, L-PRF was obtained with blood collection by means of cardiac puncture and posterior centrifugation, and inserted in the prepared bone site before implant installation. The 48 rats were randomly divided into 4 experimental groups of 12 rats each: G1- NHA implants installed; G2- NHA implants installed in association to L-PRF; G3- DAE implants installed; G4- DAE implants installed in association to L-PRF. The implants were designed for the study, measured 2.7mm in length x 1.4mm in diameter, and had the same macrostructure. The animals were euthanized 7 and 30 days (7d and 30d) after implants placement (6 from each group/period). The tibias were removed for microtomographic evaluation of the bone between the threads of the implants, analyzing the previously described parameters. Microtomographic analysis showed that the NHA implant surface presented more tridimensional bone to implant contact, bone volume fraction, bone surface/tissue volume fraction, higher number of bone trabeculae, as well as less porosity and trabecular separation, when compared to DAE surface. Furthermore, these results were more evident when NHA surface was associated to L-PRF, and in the 30 days

evaluation period. Histomorphometric evaluation showed that NHA surface presented higher BAFO when compared to DAE, with or without association to L-PRF. NHA surface was also the most benefited by the association to L-PRF treatment.

Keywords: Dental implant, Leukocyte and platelet rich fibrin, Nanohydroxyapatite.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Confecção da L-PRF.

Figura 2. Cirurgia para instalação dos implantes.

Figura 3. Implante utilizado (2,7 mm de comprimento por 1,4 mm de diâmetro).

Figura 4. Remoção e preparo do material para posterior análise tridimensional por Micro-CT e processamento histológico para a análise histomorfométrica.

Figura 5. Esquema ilustrativo dos locais das medições de BIC e BAFO.

Figura 6. Reconstrução das imagens em 3D.

Figura 7. Gráficos representando % IS/TS ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 8. Gráfico representando a % IS/TS quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 9. Gráficos representando % BV/TV dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 10. Gráfico representando a % BV/TV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 11. Gráficos representando BS/BV ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 12. Gráfico representando BS/BV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo e tratamento de superfície L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 13. Gráficos representando a % Tb.Sp internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 14. Gráfico representando a % Tb.Sp internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 15. Gráficos representando o Tb.N internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 16. Gráfico representando o Tb.N internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 17. Gráficos representando a Tb.Th (mm) internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 18. Gráfico representando a Tb.Th (mm) internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 19. Gráficos representando % Po.To ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%).

Figura 20. Gráfico representando % Po.To quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 21. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais, nos períodos de 7 e 30 dias.

Figura 22. Gráficos representando a % BIC organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 23. Gráfico representando a % BIC quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %).

Figura 24. Gráficos representando a % BAFO ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %).

Figura 25. Gráfico representando a % BAFO ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %).

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

·	Graus
°C	Graus Celsius
%	Porcento
>	Maior
<	Menor
=	Igual
α	Alfa
3D	Tridimensional
A	Área de contato
Alp	Fosfatase alcalina
BAFO	Densidade óssea ao redor do implante
BIC	Contato osso implante
BS/BV	Superfície óssea/ volume ósseo
BV/TV	Relação entre volume ósseo e superfície óssea
CA	Califórnia
COBEA	Colégio Brasileiro de experimentação animal
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	Centímetro
d	Dias

DAA	Duplo ataque ácido
DBBM	Ossos mineral bovino desproteínizado
EUA	Estados Unidos da América
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g	Gramas
IC	Intervalo de confiança
IS/TS	Contato tridimensional osso implante
Kg	Quilograma
L-PRF	Fibrina rica em plaquetas leucocitárias
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
mm	Milímetro
n	Número de animais
NANO	Nanométrica
nanoHA	Nano-hidroxiapatita
Nm	Nanômetros
Oc	Osteocalcina
Opn	Osteopontina
p	Probabilidade de significância
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
Po.To	Porosidade total
PVPI	Iodopovidona
Rank	Receptor ativador de fator nuclear kappa-

B

Rankl	Receptor ativador do fator nuclear kappa ligante
ROI	Região de interesse
RPM	Rotação por minuto
Runx2	Fator de transcrição “runt-related” 2
Seg	Segundos
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.N	Número trabecular
Tb. Th	Espessura trabecular
TGF-β	Fator de crescimento transformador - Beta
UI	Unidade internacional de medida
μL	Microlitro
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VOI	Volume de interesse

Lista de Anexos

Lista de Anexos

Anexo 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sumário

Sumário

1. Introdução	27
2. Objetivos	33
3. Material e Métodos	35
4. Resultados	45
5. Discussão	70
6. Conclusão	76
7. Referências Bibliográficas	78
8. Anexos	84

Introdução

1. Introdução

A utilização dos implantes dentários tem sido uma ferramenta de extrema relevância nas reabilitações orais. Em 1969, Brånemark e colaboradores, definiram a osseointegração como o contato direto entre o osso vivo e um implante em função, sem interposição de qualquer outro tecido (Brånemark et al., 1969). Entretanto, fatores como o tabagismo (De la Rosa et al., 2013), distribuição das cargas oclusais (Chambrone et al., 2010) e alterações sistêmicas, como por exemplo, osteoporose (Rauner et al., 2009) podem influenciar no sucesso do tratamento. Esta condição atinge predominantemente o sexo feminino com deficiência estrogênica e indivíduos idosos (Hong et al., 2018).

Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas, as características dos implantes vêm mudando ao longo dos anos, com mudanças no *design*, adição de compostos biológicos (Liu et al., 2004) e alterações na superfície (Park et al., 2005), almejando a redução no tempo de tratamento e melhor cicatrização óssea.

Tanto a morfologia quanto a rugosidade superficial dos implantes exercem uma importante influência na proliferação e diferenciação celular, na síntese da matriz extracelular, na produção de fatores locais, e até mesmo no tipo celular (Elias e Meirelles, 2010). A aderência dos osteoblastos à superfície dos implantes é necessária para que a célula receba os sinais para induzir a proliferação celular (Elias e Meirelles, 2010). A rugosidade, por sua vez, além de facilitar a retenção de células osteogênicas, permite que haja a migração para a superfície do implante através da osteocondução (Braceras et al., 2009), promove uma melhor aderência do colágeno e aumenta a área da superfície, resultando em mais sítios para a fixação das células, maior crescimento tecidual e estabilidade mecânica (Wennerberg e Albrektsson, 2010).

Nesse sentido, Klokkevold et al. (1997) realizaram um estudo comparativo da resistência ao torque de remoção de implantes de titânio com superfície usinada e superfície com ataque ácido e concluíram que o ataque ácido tem a propriedade de aumentar significativamente a osseointegração.

As superfícies de implantes evoluíram de usinadas a moderadamente ásperas, com algumas alterações químicas (Coelho et al., 2009; Albrektsson e Wennerberg, 2004 (a); Albrektsson e Wennerberg, 2004 (b)). Do ponto de vista da osseointegração precoce, estudos com avaliações histomorfométricas e biomecânicas tem demonstrado

uma maior osteocondutividade para as superfícies texturizadas, quando comparadas às usinadas (Albrektsson e Wennerberg, 2004 (a); Albrektsson e Wennerberg, 2004 (b)).

A superfície dos implantes é um dos fatores de maior relevância, pois é o primeiro componente à interagir com o hospedeiro, e modificações na mesma vêm sendo investigadas na busca de uma melhor cicatrização óssea, que permitiria a aplicação de carga imediata ou precoce aos implantes dentais (Coelho et al., 2009).

Nanoestruturas aplicadas a biomateriais tem sido utilizadas para proporcionar um grau superior de osseointegração (Ellingsen et al., 2004). Meirelles et al., 2008, realizaram um estudo em coelhos e observaram um aumento precoce da formação óssea em implantes modificados com nano-hidroxiapatita. Os autores afirmaram que esses achados podem ter sido em decorrência da possível bioatividade química da hidroxiapatita ou da topografia das nanoestruturas implementadas.

Martinez et al. (2018) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a influência de nanocristais de hidroxiapatita agregados em superfícies NANO sobre o comportamento de células osteoblásticas, em comparação a uma superfície convencional com duplo ataque ácido (DAA). Para isso, discos de titânio comercialmente puros foram confeccionados, e a proliferação e a viabilidade celulares foram avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As expressões do colágeno tipo I e osteopontina também foram analisadas. Os resultados mostraram que as células apresentaram maior espalhamento morfológico na superfície NANO quando comparada com a superfície convencional de DAA, em todos os tempos avaliados. Um aumento da proliferação e viabilidade celulares foram detectados na superfície NANO, especialmente após 72 horas. A expressão de osteopontina foi maior após 24 horas na superfície NANO quando comparada à DAA. Para o colágeno tipo I, foi observada uma maior expressão na superfície NANO também no tempo de 72 horas ($p < 0,05$). Esse estudo mostrou que a superfície NANO favoreceu os eventos iniciais da osseointegração.

Existem diversas técnicas utilizadas para avaliar a osseointegração em modelos *in vivo*. No entanto, mais recentemente, a Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) tem sido utilizada na avaliação da morfologia e microestrutura óssea, usando dados de projeções de raios X em vários ângulos para reconstruir uma representação em 3 D do modelo que caracteriza a distribuição da densidade do material, permitindo assim o estudo de estruturas de alguns micrômetros, tais como trabéculas ósseas (González-García et al., 2013).

Em 2020, Oliveira e colaboradores, em um estudo *in vivo* com ratas diabéticas, avaliaram a influência de um implante com revestimento de nano-hidroxiapatita na formação óssea, utilizando marcadores genéticos ósseos e microtomografia computadorizada. Os genes analisados foram Runx2 (runt-related transcription factor 2), Alp (alkaline phosphatase), Opn (Osteopontin), Oc (osteocalcin), Rank (receptor activator of nuclear factor-kappa B, Rank-L (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand) e Opg (osteoprotegerin). Os autores observaram que nas ratas diabéticas os implantes recobertos com nano-hidroxiapatita favoreceram a formação óssea.

Além das alterações na superfície do implante, novos produtos e protocolos tem sido estudados na tentativa de otimizar o processo de osseointegração. Com essa finalidade, surgiram os concentrados plaquetários (Pereira et al., 2007).

As plaquetas possuem altas quantidades de fatores de crescimento, como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento transformador - β) e VEGF (fator de crescimento endotelial), sendo capazes de estimular a proliferação celular, angiogênese, proliferação e diferenciação osteoblástica, bem como o remodelamento da matriz extracelular (Ehrenfest et al., 2009; Tabrizi et al., 2018). Em 2020, Schuldt e colaboradores, evidenciaram que as plaquetas também possuem propriedades antimicrobianas.

A forma mais recente disponível de concentrado plaquetário é a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), uma segunda geração de concentrados plaquetários descrita, em 2001, por Choukroun e colaboradores (Dohan et al., 2006). Neste caso, o sangue é coletado sem anticoagulante e imediatamente centrifugado, onde ocorre sua coagulação natural fornecendo um gel rico em fibrina e leucócitos, sem a necessidade de modificação bioquímica do sangue, ou seja, sem anticoagulantes, trombina ou cloreto de cálcio, tendo a vantagem de não causar nenhum tipo de reação no organismo a ser implantado (Hu et al., 2008).

Com o intuito de analisar a formação óssea após a utilização de implantes com tratamento nanométrico e com L-PRF, Neiva et al. (2016) avaliaram, em cães, os efeitos da presença de L-PRF e da textura da superfície do implante na cicatrização óssea em torno de implantes imediatamente instalados. A L-PRF foi utilizada para preencher o *gap* entre o implante e as paredes do alvéolo em um lado da mandíbula. O lado contralateral recebeu implantes sem L-PRF. Os autores observaram que a associação de L-PRF com a superfície nanométrica do implante resultou em aumento da formação óssea em torno de implantes.

Em estudo semelhante, Öncü et al. (2016) analisaram o efeito da L-PRF nos procedimentos de regeneração óssea e osseointegração em coelhos. Foram criadas duas cavidades de implante (5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) em cada tíbia, com um total de quatro cavidades em cada animal. Duas dessas cavidades foram selecionadas e cobertas com L-PRF (grupo teste), enquanto as outras duas tiveram a L-PRF e os implantes instalados. Foram obtidas amostras histológicas e os tecidos peri-implantares foram avaliados histomorfometricamente para contato osso-implante e neoformação óssea. Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação de L-PRF pode aumentar a quantidade e a taxa de formação de osso novo durante o período de cicatrização precoce e proporcionar uma osseointegração mais rápida.

Em uma revisão sistemática, Castro et al. (2017) estudaram o efeito da L-PRF nos procedimentos de regeneração óssea e osseointegração. Foi verificado que a L-PRF sozinho melhora a preservação da largura alveolar, resultando em menor reabsorção óssea vestibular em comparação com a cicatrização natural, em que o alvéolo dentário foi preenchido com coágulo sanguíneo. A L-PRF melhorou a estabilidade do implante ao longo do tempo e gerou menos perda óssea marginal.

Pichotano et al. (2019), em um estudo clínico randomizado, avaliaram se a associação da L-PRF ao osso mineral bovino desproteínizado (DBBM), diminuiria ou não o tempo para a colocação de implantes, após cirurgia de aumento do seio maxilar. Os autores observaram que a adição da L-PRF ao DBBM, por favorecer o aumento da formação óssea, reduziu, consideravelmente, o tempo para a colocação dos implantes. No grupo teste (com L-PRF) os implantes foram colocados após 4 meses, ao passo que, no grupo controle (sem L-PRF), os implantes só puderam ser colocados após 8 meses da realização da cirurgia de aumento do seio maxilar.

Em 2020, Canellas et al., avaliaram tomográfica e histomorfométricamente a cicatrização de alvéolos após exodontia utilizando ou não a L-PRF. A análise histomorfométrica mostrou uma alta porcentagem de formação de novo osso no grupo com L-PRF em comparação ao grupo controle (sem L-PRF), indicando que a administração da L-PRF deve ser sempre considerada quando a preservação do alvéolo for necessária.

Em 2021, Lyrís e colaboradores, também em uma revisão sistemática e meta-análise avaliaram o efeito da aplicação de L-PRF na estabilidade dos implantes dentários. A estabilidade dos implantes foi avaliada imediatamente, uma semana e

quatro semanas após a inserção dos implantes. Os resultados obtidos sugerem que a L-PRF beneficia a estabilidade secundária (biológica) dos implantes.

Assim, tendo em vista o desenvolvimento de novas superfícies de implantes com processos visando à melhora qualitativa e quantitativa do fenômeno de osseointegração, bem como o surgimento de fatores de crescimento que possam influenciar nesse processo, é oportuna a realização de um estudo *in vivo* para avaliar o comportamento de uma superfície de implante modificada pela adição de nano-hidroxiapatita, associada ou não à L-PRF.

Objetivos

2. Objetivos

Avaliar, *in vivo*, utilizando ratas saudáveis, uma superfície de implantes com nanopartículas de hidroxiapatita (nanoHA), associada ou não à L-PRF, por meio de:

a. Análise microtomográfica (micro-CT): avaliação, no osso interno às roscas dos implantes, dos seguintes parâmetros tomográficos: contato tridimensional osso implante (IS/TS, %), densidade óssea tridimensional (a relação entre volume ósseo e volume total - BV/TV, %), relação entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV, mm), separação trabecular (Tb.Sp, %), número de trabéculas (Tb.N), Espessura Trabecular (Tb.Th, mm) e porosidade total (Po.To, %);

b. Análise histomorfométrica: avaliação do contato osso-implante (BIC) e da densidade óssea ao redor dos implantes (BAFO).

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 - Comissão de Ética

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do campus da USP-Ribeirão Preto, sob o protocolo número 2018.1.164.58.4. (Anexo 1). Os procedimentos foram iniciados após a aprovação pela referida comissão e foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 - Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate* 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80 % na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando-se o desvio-padrão médio dos grupos experimentais do estudo de Pyo et al. (2014), reconhecendo a diferença significativa de 10% (δ) entre os grupos, intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), desvio padrão (σ) de 9,18%, as mudanças na média de BIC como variável primária e $[Z\alpha (1.96) + Z\beta (0.84)]^2 = 7.84$. O cálculo da amostra por grupo foi baseado na fórmula: $n \geq \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$. O número mínimo necessário foi de 6 animais por grupo experimental.

3.3 - Caracterização da amostra

Foram selecionadas 48 ratas adultas, do tipo *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* com peso entre 200 a 250 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas com alimento e água *ad libitum* antes e durante o período experimental, e permaneceram no biotério da FORP-USP em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22° e 24° C.

3.4 - Confeção de concentrado plaquetário (L-PRF)

Através de punção cardíaca, foram coletados 500 μ L de sangue, transferidos para tubo adequado sem anticoagulante e colocados imediatamente em centrífuga (ANVLAB Equipamentos para Laboratórios, São Paulo, Brasil) com velocidade de 2.700 rpm por 12 minutos (Miron et al., 2019). O produto resultante é constituído por

três camadas: a superior composta por plasma pobre em plaquetas; a porção média, formada pela L-PRF; e a inferior, contendo células sanguíneas vermelhas (Figura 1). Para a obtenção correta da L-PRF é necessária a rápida coleta sanguínea e sua imediata centrifugação antes da formação dos eventos de coagulação. A L-PRF foi obtida em forma de membrana pela simples eliminação dos fluidos da amostra sanguínea.



Figura 1. Confeção da L-PRF. A) Tubo evidenciando as camadas. B) Aspecto da membrana. C) Após o recorte da membrana, fragmento da mesma medindo 3 mm.

3.5 - Instalação dos implantes

A cirurgia para instalação dos implantes foi realizada de acordo com o descrito por Prado et al., 2006. Os animais foram primeiramente pesados para o correto cálculo anestésico. A anestesia geral foi obtida pela associação de 0,08 mL/100 g de Cloridrato de Ketamina (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e 0,04 mL/100 g de Cloridrato de Xilazina (Rompum; Bayer SA, São Paulo, SP, Brasil) por injeção via intramuscular. Posteriormente, os animais foram colocados em uma placa de contenção na posição de decúbito dorsal. Foi realizada a tricotomia e logo em seguida, com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, a assepsia local, utilizando uma solução de PVPI a 1 %.

Subsequentemente, foi realizada uma incisão na perna direita dos animais, medindo aproximadamente 2 cm, paralela ao longo do eixo da tíbia (Figura 2 A). O local de eleição para a incisão foi estabelecido pela porção mais volumosa do tecido ósseo, através da palpação. O tecido muscular foi seccionado até a exposição do periósteo, utilizando um cabo de bisturi nº 3, montado com lâmina de bisturi nº 15 (Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra). O descolamento foi realizado utilizando os descoladores de Freer e de Molt e com o auxílio de uma pinça de Adson com dente. Esses mesmos instrumentos, juntamente com uma pinça anatômica, auxiliaram no afastamento do retalho e estabilização da tíbia (Figura 2 B). Como essa região não provoca um sangramento abundante, a secagem do campo operatório foi realizada com gaze estéril.

A osteotomia para a instalação dos implantes foi realizada com fresa apropriada sob constante irrigação com soro fisiológico, conforme recomendado pelo fabricante (S.I.N. – Sistema de Implante, São Paulo-SP) (Figura 2 C e D). Previamente à instalação dos implantes, nos grupos de associação à L-PRF, esta foi introduzida no leito ósseo preparado (Figura 2 E e F). Os implantes foram então instalados de forma que as roscas ficassem completamente introduzidas no interior do osso cortical (Figura 2 G). O ato operatório foi finalizado com o fechamento primário dos tecidos por meio de suturas por planos (Figura 2 H), utilizando fios de sutura absorvíveis (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil).

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular de 24.000 UI/kg de Penicilina G-benzatina na dose de 0,01 mL para cada 100 g do peso corpóreo do animal (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP), um anti-inflamatório (Buprenorfina, Plurivet Richter Pharma AG, Austria, Inglaterra) na concentração de 0,3 mg/mL – dose 0,05 mg/kg - Injeção subcutânea, 12/12 horas). Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi feita aos animais após a cirurgia, e os mesmos foram mantidos em caixas plásticas apropriadas durante todo o período experimental.

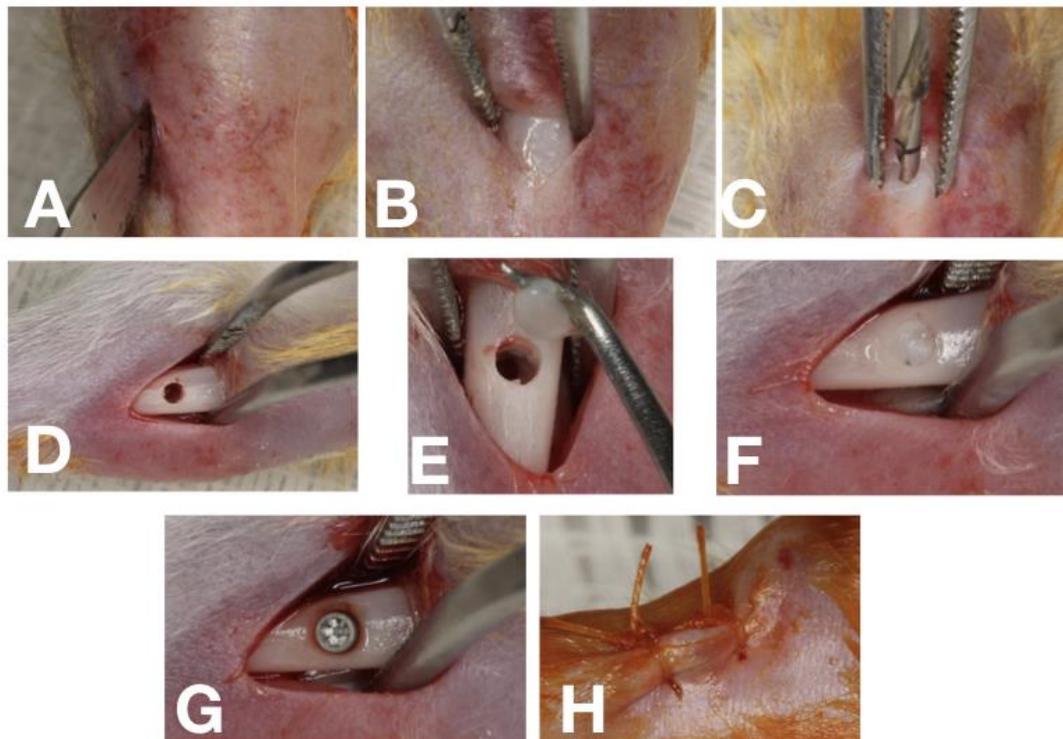


Figura 2. Cirurgia para instalação dos implantes. A) Incisão medindo aproximadamente 2 cm, paralela ao longo do eixo da tibia. B) Aspecto encontrado após abertura do retalho. C) Preparo do leito com fresa. D) Leito cirúrgico preparado. E) L-PRF previamente à inserção no leito. F) L-PRF inserida na cavidade. G) Implante instalado com as roscas completamente introduzidas no interior do osso cortical. H) Síntese.

3.6 - Grupos experimentais

Os 48 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, cada qual contendo 12 ratas:

- GRUPO 1 (n=12) – superfície nanoHA - Foram instalados nas tíbias de ratas saudáveis mini-implantes com superfície com adição de nano-hidroxiapatita;

- GRUPO 2 (n=12) – superfície nanoHA + L-PRF - Foram instalados nas tíbias de ratas saudáveis mini-implantes com superfície com adição de nano-hidroxiapatita, associada ao uso de L-PRF;

- GRUPO 3 (n=12) – superfície Duplo Ataque Ácido (DAA) - Foram instalados nas tíbias de ratas saudáveis mini-implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido.

- GRUPO 4 (n=12) – superfície Duplo Ataque Ácido (DAA) + L-PRF - Foram instalados nas tíbias de ratas saudáveis mini-implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido, associada ao uso de L-PRF.

Todos os mini-implantes foram exclusivamente preparados pela empresa S.I.N. para esta pesquisa e apresentam macroestrutura igual, com formato de parafuso e as seguintes dimensões: 2,7 mm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro (Figura 3).



Figura 3. Implante utilizado (2,7 mm de comprimento por 1,4 mm de diâmetro).

3.7 - Eutanásia e remoção das peças

Os animais foram eutanasiados 7 e 30 dias após a instalação dos implantes (24 animais para cada tempo, 6 de cada um dos grupos experimentais) pela administração de uma sobredose anestésica intraperitoneal (150 mg/ kg) de tiopentato de sódio (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e feita a confirmação da morte dos animais após a eutanásia. Para isso, todos os sinais a seguir foram observados para confirmar a morte do animal: ausência de movimento respiratório (apnéia); ausência de batimentos cardíacos (assistolia) - com o uso de estetoscópio; ausência de pulsação; mucosas pálidas; e perda do reflexo corneal. A confirmação da morte foi realizada por profissional qualificado para tal fim (veterinário do biotério da FORP-USP). Subsequentemente, as tíbias direitas foram removidas (Figura 4) e fixadas para posterior análise tridimensional por Micro-CT e processamento histológico para a análise histomorfométrica.

Após a remoção das tíbias, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer (-20° C), onde permaneceram até a coleta de lixo hospitalar. A coleta foi feita por uma empresa terceirizada, em carros especiais, e levada ao incinerador público.

Após a remoção das tíbias, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer (-20° C), onde permaneceram até a coleta de lixo hospitalar. A coleta foi feita por uma empresa terceirizada, em carros especiais, e levada ao incinerador público.

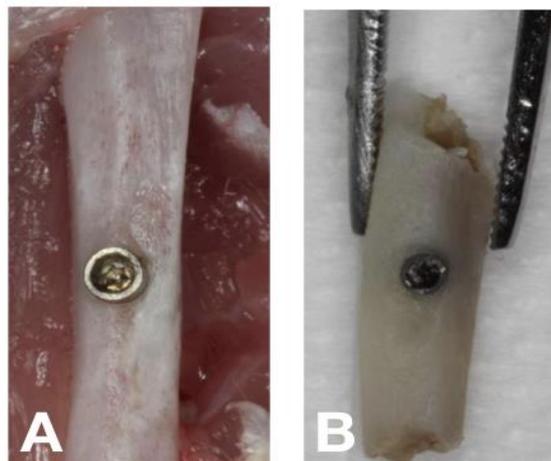


Figura 4. Remoção e preparo do material para posterior análise tridimensional por Micro-CT e processamento histológico para a análise histomorfométrica. A) Aspecto inicial. B) Tíbia removida.

3.8 - Análise microtomográfica

Após 48 horas de fixação em formol tamponado a 10%, as amostras foram escaneadas utilizando o microtomógrafo SkyScan 1172-160 micro-CT de alta resolução (Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) para a obtenção das projeções tomográficas bidimensionais e a reconstrução tridimensional. Todos os escaneamentos foram obtidos em 100 kV e 100 μ A, usando um filtro de alumínio-cobre para otimizar o contraste, e definido em 5,87 mm de tamanho de pixel, rotação de 360°, um passo de rotação de 0,40. As projeções tomográficas bidimensionais e a reconstrução tridimensional foram realizadas utilizando o *software* NRecon (NRecon v.1.6.10.4, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) e os implantes foram posicionados no seu longo eixo utilizando o *software* DataViewer (v.1.5.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica), onde foi possível a movimentação e visualização dos três eixos (coronal, axial e sagital). Foi selecionado o eixo de interesse (sagital) para a visualização completa dos implantes.

Subsequentemente, as reconstruções foram submetidas a análise morfométrica utilizando o *software* CT Analyser (CTAn., v.1.15.4.0, Bruker, Kontich, Antwerp, Bélgica) para a avaliação, no osso interno às roscas dos implantes, dos seguintes parâmetros tomográficos: contato tridimensional osso implante (IS/TS, %), relação entre volume ósseo e volume total (BV/TV, %), relação entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV, mm), separação trabecular (Tb.Sp, %), número de trabéculas (Tb.N), Espessura Trabecular (Tb.Th, mm) e porosidade total (Po.To, %).

No CTAn foi utilizada uma ferramenta de análise avançada (*custom processing*), onde foi criada uma lista de tarefas para análise dos parâmetros adotados. As medições foram feitas a partir de 1 mm da porção mais coronal do implante, atingindo todo o seu comprimento. Esse processo envolveu a determinação região de interesse (ROI). A soma coletiva de todos os ROIs sobre um conjunto contíguo de fatias da imagem transversal foi usada para determinar o volume de interesse (VOI), representando o volume 3D selecionado. A transformação em código binário foi realizada usando a escala de cinza definida por uma densidade de 35-150 para osso, e 150-255 para implante. Todas as análises de micro-CT foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais.

3.9 - Preparo das peças para Histomorfometria

Após a realização da microtomografia, com os implantes instalados, as tíbias foram preparadas para a avaliação histomorfométrica (cortes não descalcificados), conforme sequência descrita a seguir.

3.9.1 - Fixação e desidratação

Cada amostra foi colocada em frasco de vidro contendo o fixador: solução de formalina 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) em pH 7, por 10 dias, à temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram transferidas para uma solução de etanol a 70 % por 72 horas e, então, desidratados em gradiente de etanol em concentrações ascendentes (soluções 70 %, 95 % e 100 %).

3.9.2 - Inclusão

Após a desidratação, as tíbias foram incluídas em resina Hard Grade LR White (London Resin Company, Berkshire, Inglaterra, id).

3.9.3 - Secção

As peças incluídas em resina foram submetidas a um sistema de microdesgaste (Exakt, Alemanha) pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner 1982, de forma a obter lâminas de aproximadamente 50 a 80 μm . Os cortes foram montados em lâminas histológicas para análise, sendo corados com *Stevenel's blue e Alizarin red S*.

3.10 - Análise histomorfométrica

Uma secção histológica longitudinal de 50-80 μ m de espessura de cada implante foi captada através de uma câmara de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha) acoplada a um estereomicroscópio Leica MZFL III (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha). As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) para a determinação da porcentagem de contato osso-implante e da densidade óssea (porcentagem de área de trabéculas ósseas em relação à área óssea total) das áreas adjacentes e distantes aos implantes.

Para avaliação histomorfométrica, um *software* de análise de imagens (Image J, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) foi utilizado para quantificar e avaliar os parâmetros de osseointegração em torno da superfície peri-implantar. A porcentagem de contato osso-implante (% BIC) quantificou o grau de osseointegração derivada da estabilidade primária, medindo a porcentagem de osso em contato com o perímetro da superfície do implante (Figura 5 A). Já a densidade óssea ao redor dos implantes % BAFO avaliou o grau de osseointegração derivada da estabilidade secundária, medindo a porcentagem de osso (osso neoformado, osso nativo recém-formado e não vital devido à instrumentação) dentro das roscas do implante (Figura 5 B) (Jinno et al., 2017). Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais.

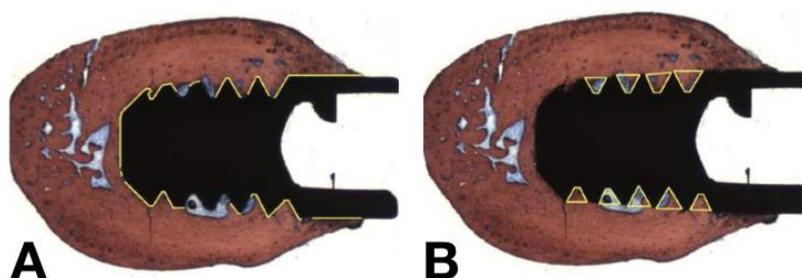


Figura 5. Esquema ilustrativo dos locais das medições de BIC (A) e BAFO (B).

3.11 - Análise estatística

Todas as variáveis foram apresentadas em função dos valores médios com o intervalo de confiança correspondente a 95 % (média \pm 95 % IC). Análises preliminares mostraram variâncias indistinguíveis (teste de Levene, todas $p > 0,25$). Adicionalmente,

os dados foram coletados e alinhados ao longo de um modelo linear misto com fatores fixos de tempo (7 e 30 dias), modificações de superfície (duplo ataque ácido e nano-hidroxiapatita) e L-PRF (presença ou ausência). Teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. A análise foi realizada usando SPSS (IBM SPSS 23, IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

Resultados

4. Resultados

Não houve intercorrências / complicações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos realizados nos animais. As ratas recuperaram a consciência em média 30 minutos após a realização dos procedimentos cirúrgicos e o período pós-operatório transcorreu sem intercorrências. Adicionalmente, não foram detectados quaisquer eventos adversos, como exposição do implante ou alteração cardíaca. Foi observado um aspecto clinicamente saudável em todas as áreas operadas no decorrer de todo o período experimental.

4.1 - Resultados Microtomográficos

As imagens reconstruídas em 3 D de todos os grupos experimentais estão evidenciadas na Figura 6 (A-H). Todas as imagens confirmam um reparo ósseo bem-sucedido, independentemente do tempo, tipo de tratamento de superfície do implante e uso ou não de L-PRF. Em termos gerais, houve diferença para todos os grupos entre 7 e 30 dias, evidenciando uma maior formação óssea ao longo do tempo. O grupo 2 (nano-HA + L-PRF) mostrou um maior reparo ósseo quando comparado à superfície DAA. Além disso, a superfície nano-HA também mostrou os melhores resultados na associação à L-PRF.

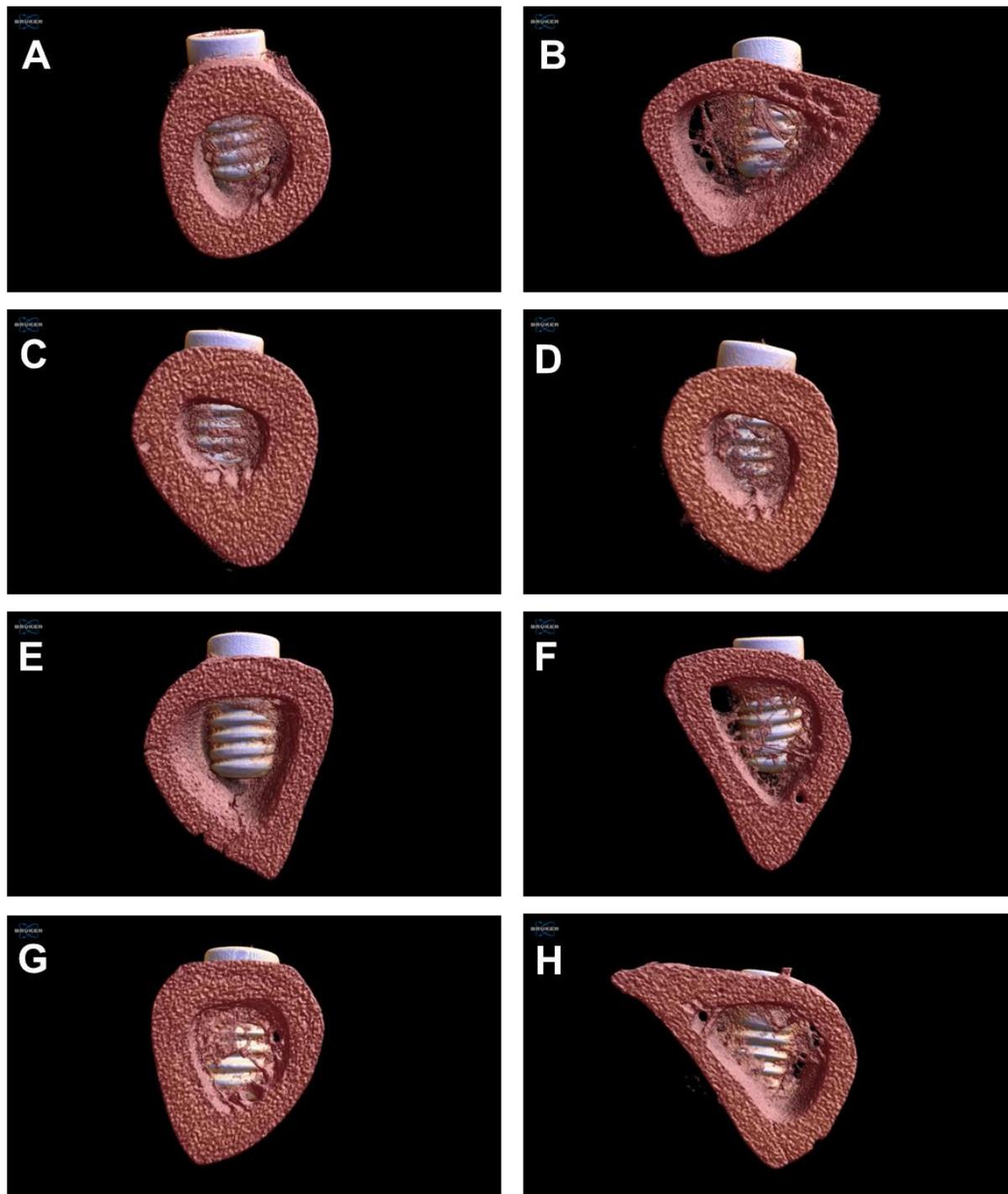


Figura 6. Reconstrução das imagens em 3 D. A) G1 7 dias. B) G1 30 dias. C) G2 7 dias. D) G2 30 dias. E) G3 7 dias. F) G3 30 dias. G) G4 7 dias. H) G4 30 dias.

4.1.2 - Contato tridimensional osso implante (IS/TS)

A porcentagem do contato tridimensional osso implante (% IS/TS) em função do tempo demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre 7 ($48,05 \pm 3,70$) e 30 ($56,29 \pm 3,70$) dias ($p=0,003$) (Figura 7 A). Ao considerar a superfície do implante, a nanoHA, ($56,56 \pm 3,70$) exibiu maior % IS/TS em relação à DAA ($47,78 \pm 3,70$) ($p=0,002$) (Figura 7 B). Não houve diferença estatisticamente significativa quando se avaliou apenas a presença ou não da L-PRF (Figura 7 C). A avaliação dos dados em função da superfície do implante na presença ou não da L-PRF, evidenciou uma superioridade para a superfície nanoHA em presença da L-PRF ($57,08 \pm 5,23$) em relação à superfície DAA na presença da L-PRF ($46,75 \pm 5,23$) ($p=0,007$) (Figura 7 D). Quando a % IS/TS foi avaliada em função do tempo e da superfície do implante, a superfície DAA aos 7 dias ($45,32 \pm 5,23$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a 30 dias ($50,25 \pm 5,23$) ($p=0,003$). Aos 7 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes superfícies (DAA x nanoHA); entretanto, aos 30 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies testadas ($p=0,002$) (Figura 7 E). Ao se considerar o tempo e a presença ou não da L-PRF, houve diferença estatisticamente significativa entre o 7º ($47,33 \pm 5,23$) e o 30º dias ($56,50 \pm 5,23$) ($p=0,016$) quando se utilizou a L-PRF (Figura 7 F). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e presença da L-PRF), os resultados evidenciaram a existência de diferença estatisticamente significativa entre o 7º ($44,07 \pm 7,30$) e o 30º dias ($49,43 \pm 7,30$) ($p=0,016$), quando a L-PRF foi utilizada com a superfície DAA. Aos 30 dias, também foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 ($63,56 \pm 7,30$) e 4 ($49,43 \pm 7,30$) ($p=0,009$) (Figura 8).

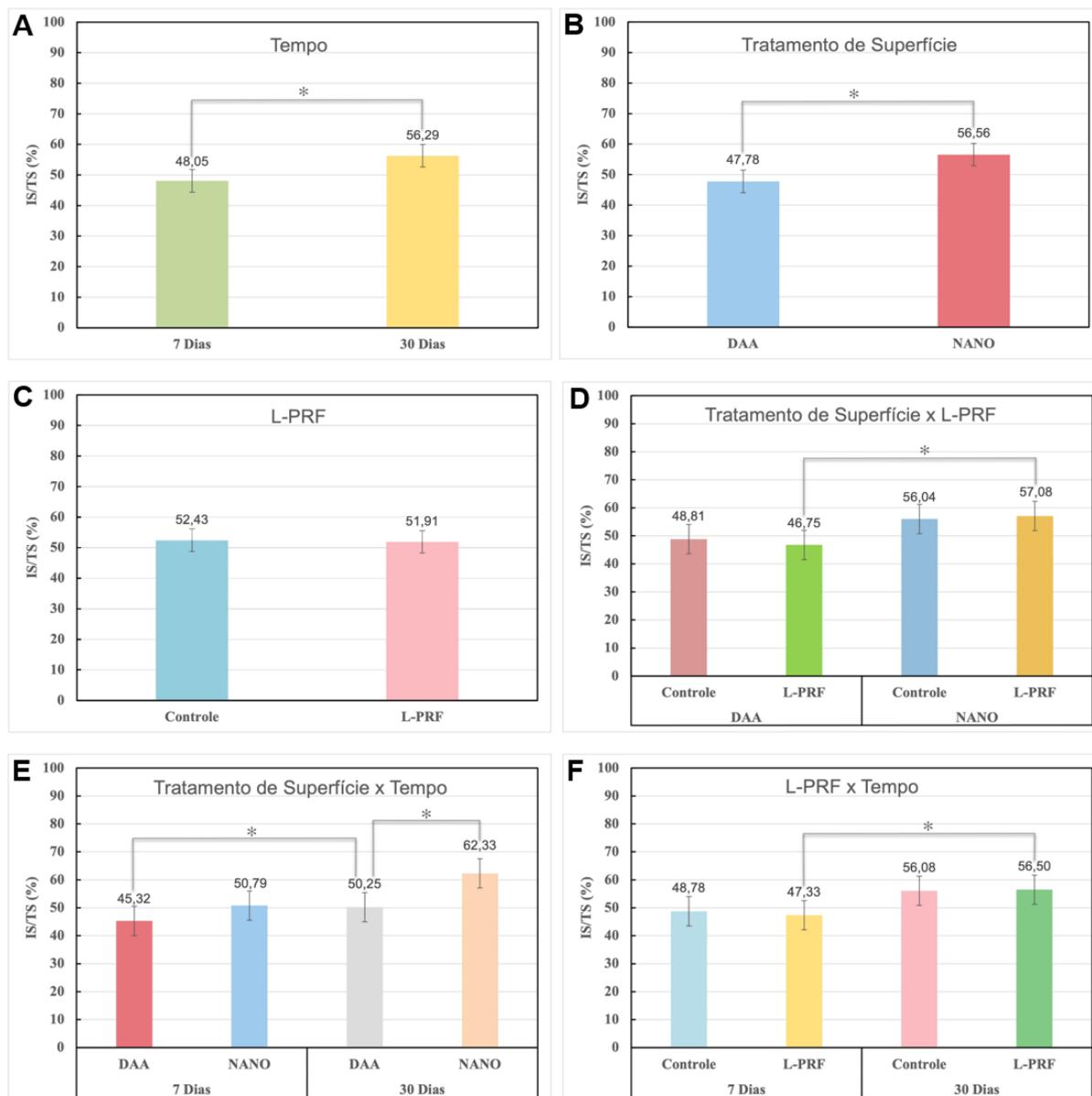


Figura 7 A-F. Gráficos representando % IS/TS ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função da superfície do implante (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função da superfície do implante na presença ou não da L-PRF (D). Em função do tempo e do tratamento de superfície (E). Em função do tempo e da L-PRF (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

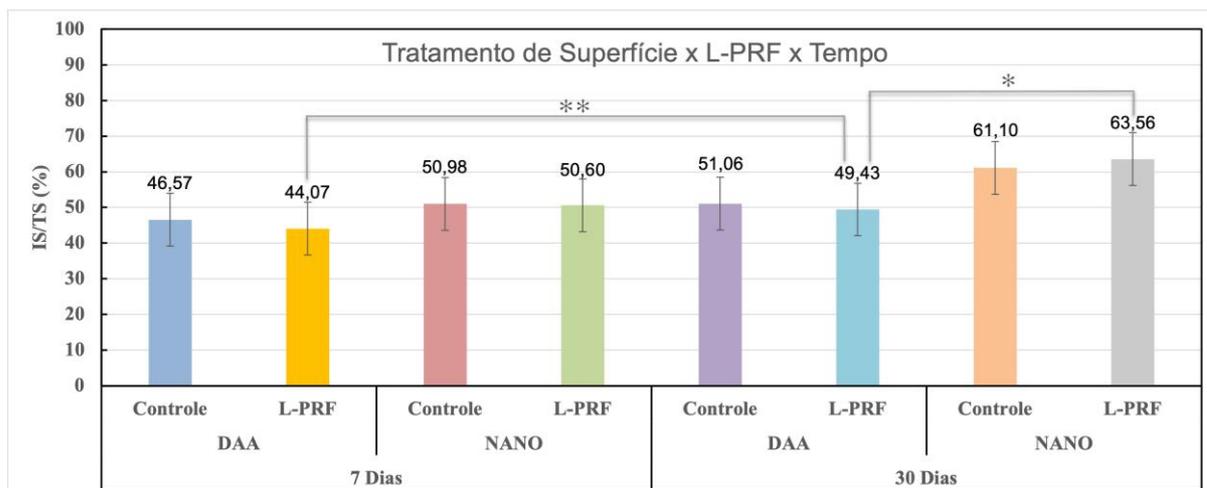


Figura 8. Gráfico representando a % IS/TS quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.3 - Densidade óssea tridimensional (BV/TV, %)

A porcentagem da densidade óssea tridimensional (% BV/TV) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias (Figura 9 A). Ao considerar isoladamente a superfície do implante, a superfície nanoHA exibiu maior % BV/TV ($49,88 \pm 3,98$) em relação à superfície DAA ($40,30 \pm 3,98$) ($p=0,001$) (Figura 9 B). A análise isolada da utilização ou não da L-PRF não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 9 C). Avaliando o tratamento de superfície em relação à L-PRF (Figura 9 D), a superfície nanoHA foi superior à superfície DAA tanto na presença ($48,96 \pm 5,63$ e $40,09 \pm 5,63$, respectivamente) ($p=0,030$) como na ausência ($50,79 \pm 5,63$ e $40,52 \pm 5,63$, respectivamente) ($p=0,013$) do concentrado plaquetário. Comparando tratamento de superfície e tempo (Figura 9 E), houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHA e DAA tanto aos 7 ($p=0,023$), quanto aos 30 dias ($p=0,017$). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados evidenciaram que a superfície nanoHA apresentou os melhores resultados numéricos em relação à superfície DAA tanto aos 7 como aos 30 dias, para os grupos com e sem L-PRF, sem que houvesse, entretanto, diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 10).

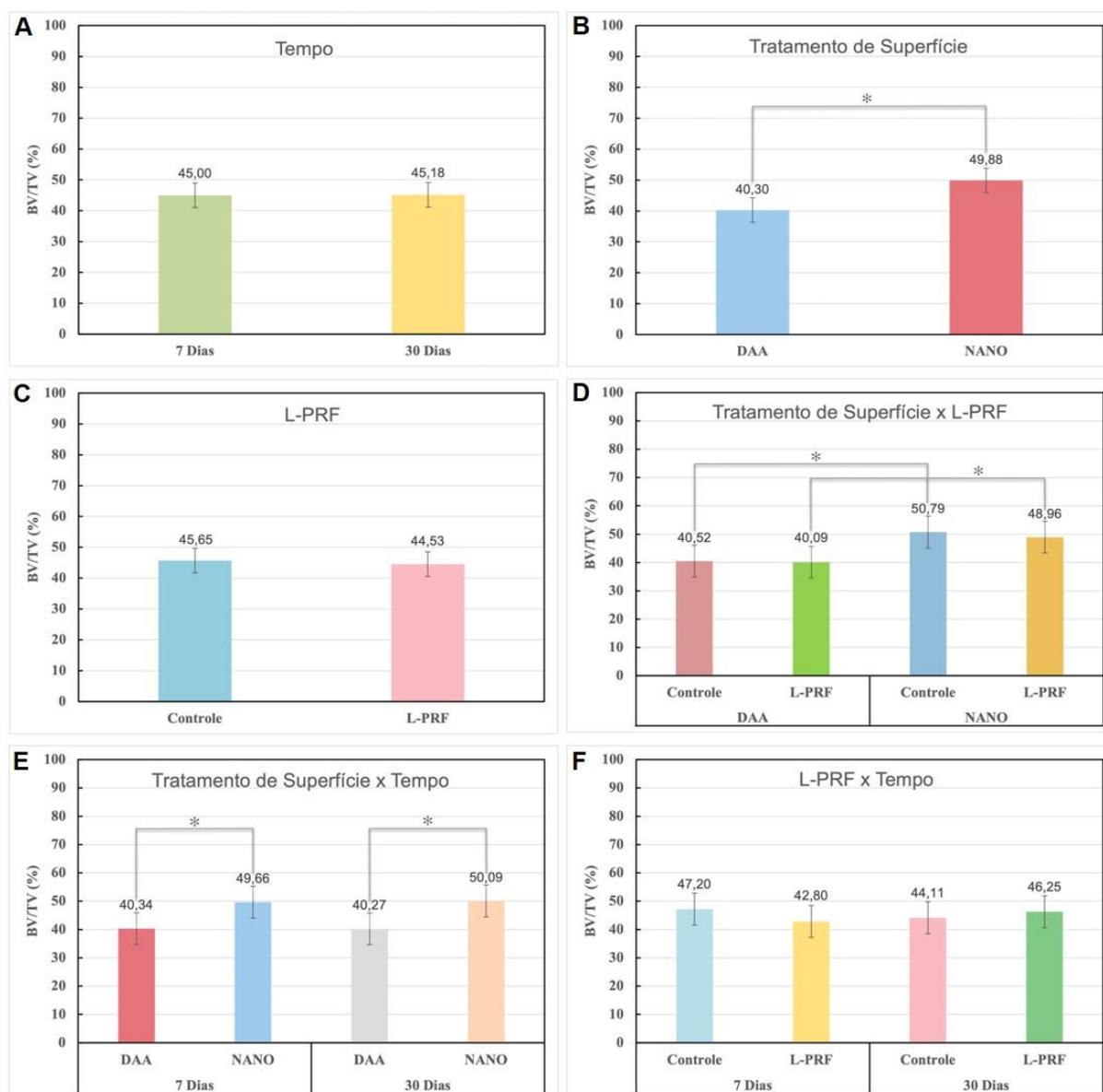


Figura 9. A-F. Gráficos representando % BV/TV dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tratamento de superfície e do tempo (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

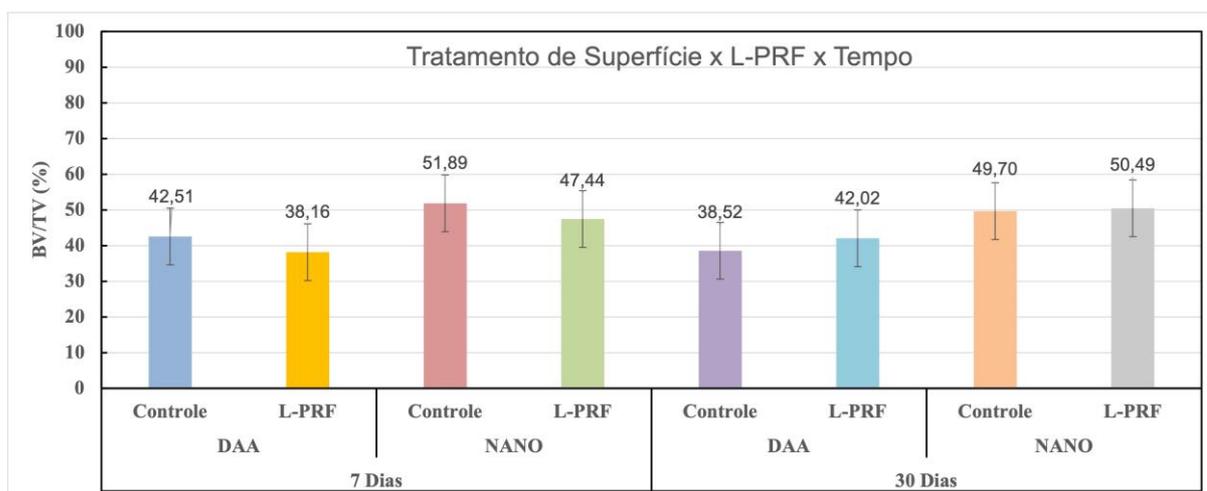


Figura 10. Gráfico representando a % BV/TV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.4 - Relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV)

A relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV) em função do tempo (Figura 11 A), em função do tratamento de superfície (Figura 11 B) e em função da L-PRF (Figura 11 C) não demonstrou diferenças estatisticamente significantes. A avaliação dos dados em função da superfície do implante associada ou não à L-PRF (Figura 11 D), evidenciou que houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHA ($31,69 \pm 3,40$) e DAA ($37,41 \pm 3,40$) ($p=0,021$). Quando a BS/BV foi avaliada em função da superfície e do tempo e em função da L-PRF e do tempo, não houve diferenças estatisticamente significantes (Figuras 11 E e 11 F, respectivamente). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados evidenciaram que a superfície nanoHA exibiu diferença estatisticamente significativa entre o 7° ($31,15 \pm 4,81$) e o 30° ($32,22 \pm 4,81$) dias ($p=0,043$); quando associada à L-PRF, a superfície nanoHA também mostrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias ($p=0,019$). Aos 30 dias, o Grupo 3 se mostrou superior ao Grupo 1 ($p=0,013$) (Figura 12). Ainda aos 30 dias, o Grupo 2 ($34,87 \pm 4,81$) mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) em relação ao Grupo 1 ($32,22 \pm 4,81$).

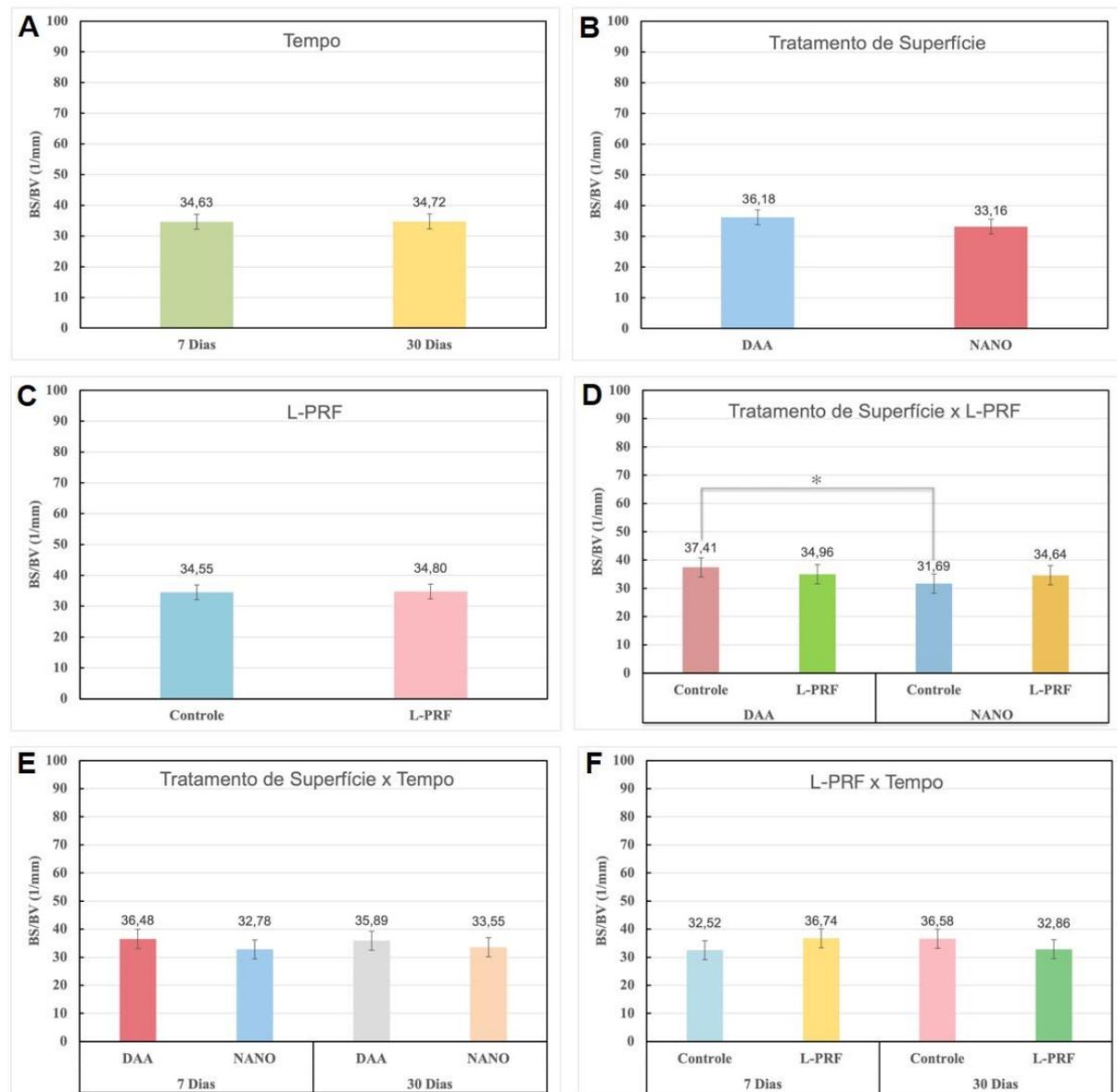


Figura 11. A-F. Gráficos representando BS/BV ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e da L-PRF (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da superfície e da L-PRF (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

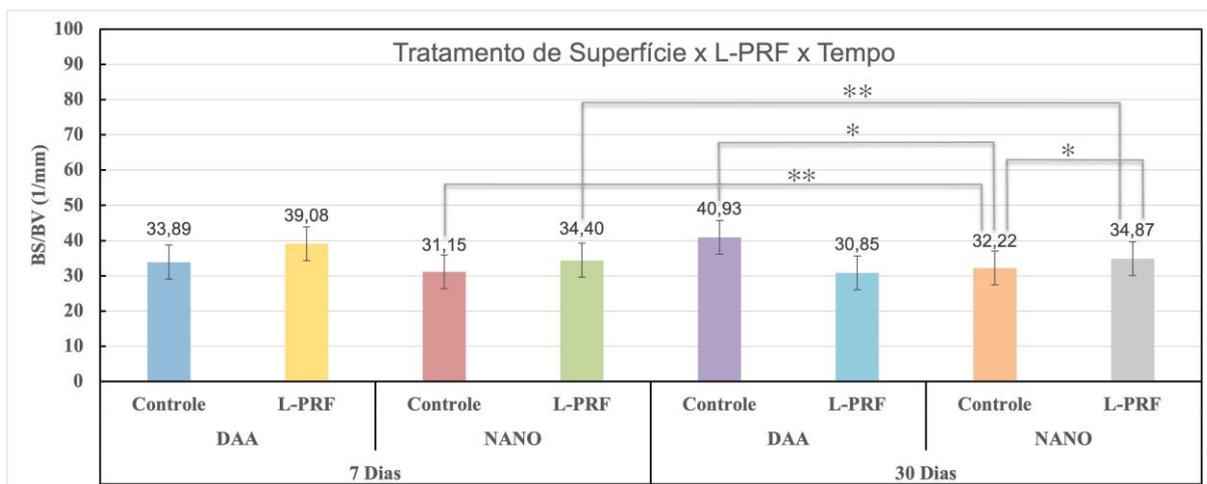


Figura 12. Gráfico representando BS/BV quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo e tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.5 - Separação Trabecular (Tb.Sp)

A separação trabecular (Tb.Sp) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias ($p = 0,840$) (Figura 13 A). Houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHA ($0,13 \pm 0,01$) e DAA ($0,14 \pm 0,01$) ($p = 0,004$) (Figura 13 B). Ao considerar o fator L-PRF, não houve diferença entre sua presença ou ausência (Figura 13 C). Houve diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,004$) ao comparar os tratamentos de superfície associados ou não à L-PRF (Figura 13 D). A avaliação dos dados em função da superfície do implante e do tempo demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa para a superfície nanoHA em relação à superfície DAA aos 30 dias ($p = 0,005$) (Figura 13 E). Ao avaliar a Tb.Sp em função da L-PRF e do tempo, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 13 F). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados mostram que aos 30 dias houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$) entre os grupos 2 ($0,15 \pm 0,01$) e 4 ($0,12 \pm 0,01$) (Figura 14).

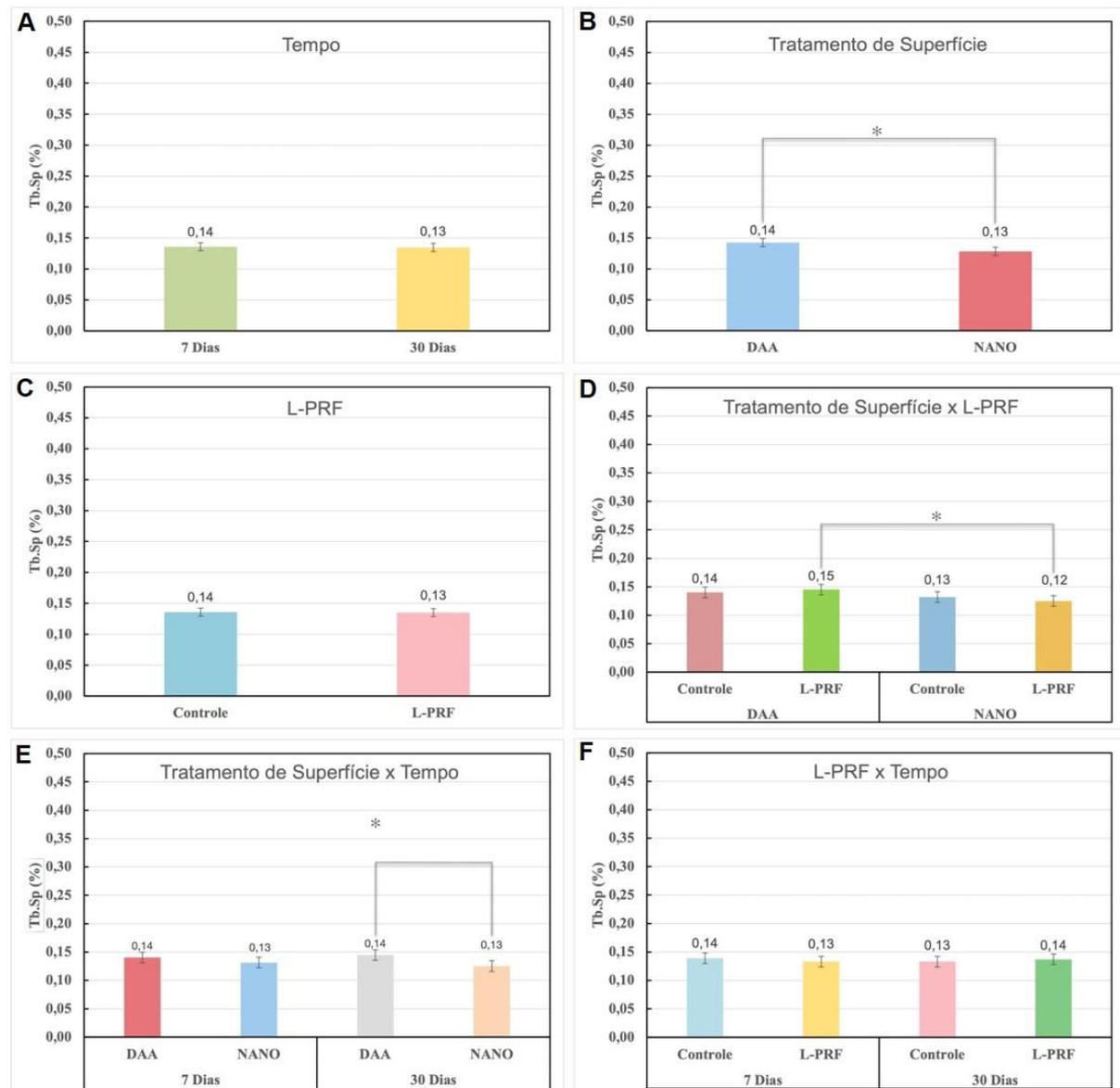


Figura 13. A-F. Gráficos representando a % Tb.Sp internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tratamento de superfície e do tempo (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

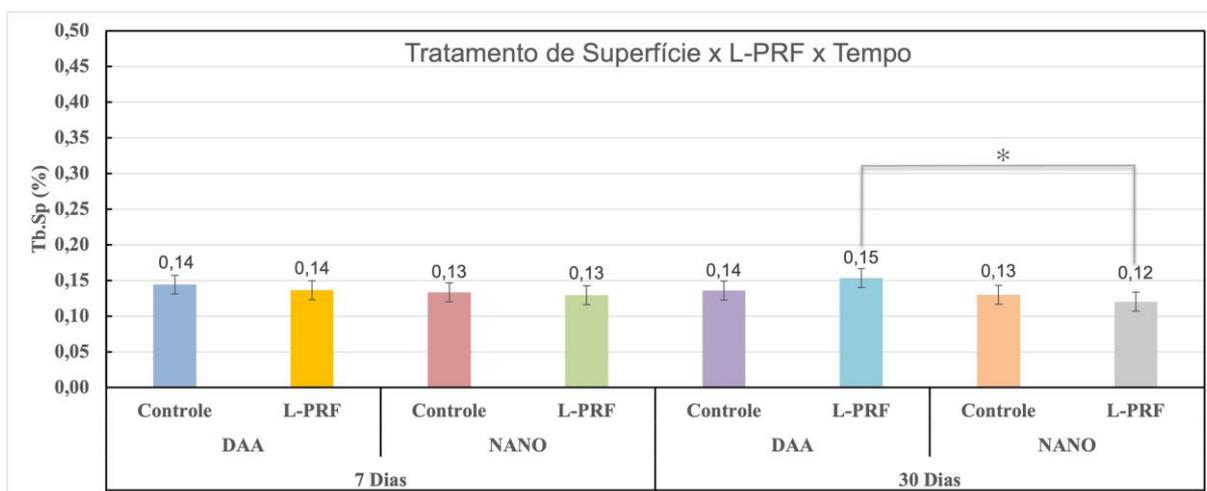


Figura 14. Gráfico representando a % Tb.Sp internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.6 - Número de Trabéculas (Tb.N)

O número de trabéculas em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias ($p = 0,096$) (Figura 15 A). Houve diferença significativa entre as superfícies nanoHA ($4,27 \pm 0,35$) e DAA ($3,67 \pm 0,35$) ($p = 0,019$) (Figura 15 B). Ao considerar apenas presença da L-PRF, não houve diferença entre sua presença ou ausência (Figura 15 C). Houve diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,022$) ao comparar o tratamento de superfície em presença ou não da L-PRF (Figura 15 D). A avaliação dos dados em função da superfície do implante e do tempo demonstrou que houve diferença estatística para o grupo nanoHA ($4,54 \pm 0,5$) em relação ao grupo DAA ($3,82 \pm 0,50$) aos 30 dias ($p = 0,046$) (Figura 15 E). Ao avaliar o Tb.N em função da L-PRF e do tempo, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 15 F). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 16).

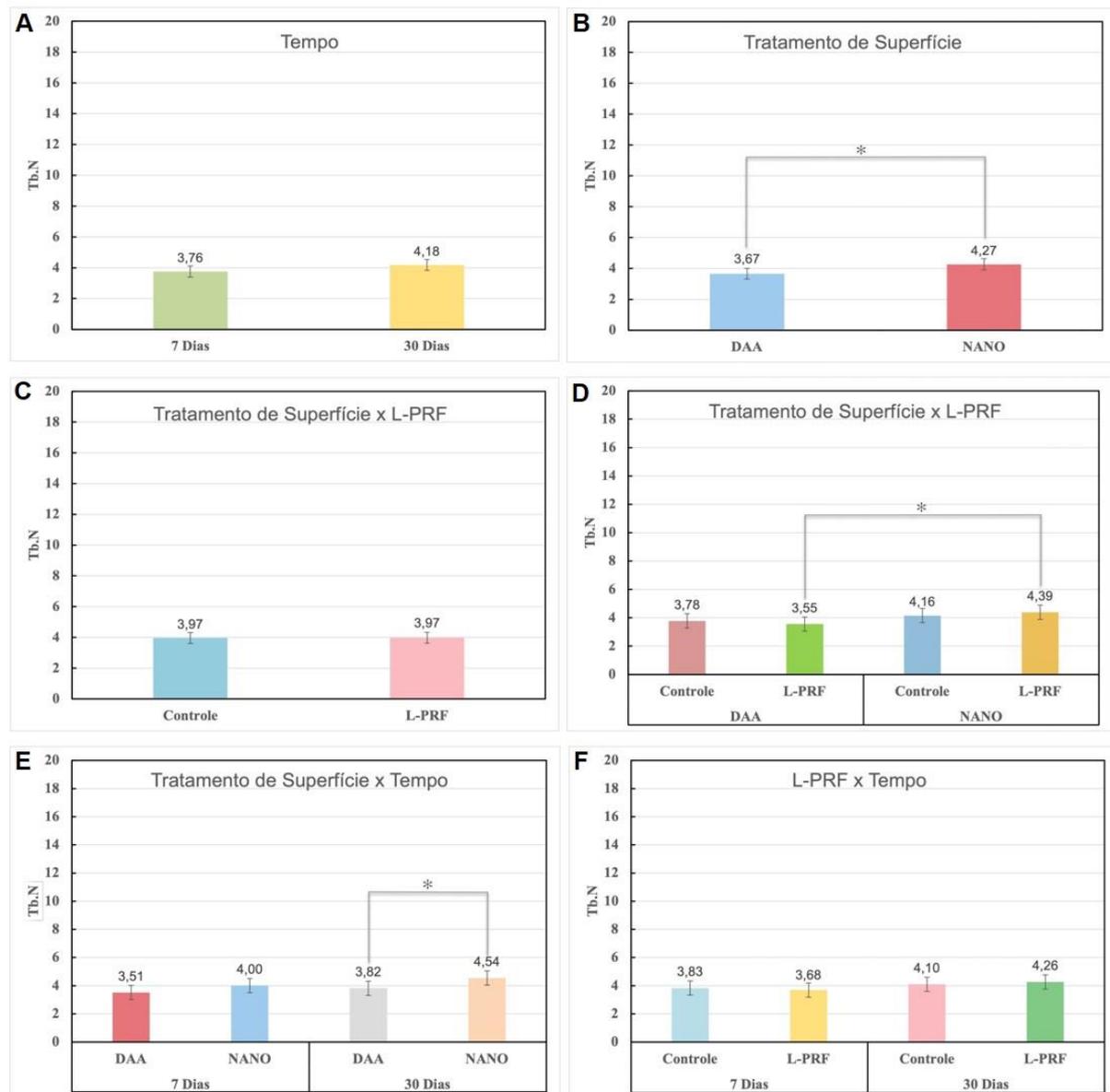


Figura 15. A-F. Gráficos representando o Tb.N internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tratamento de superfície e do tempo (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

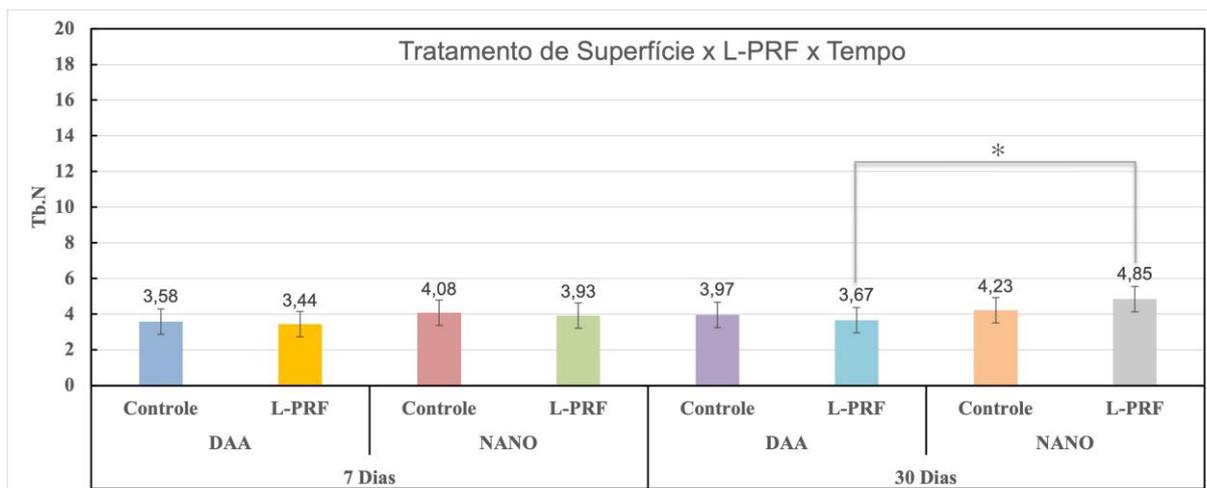


Figura 16. Gráfico representando o Tb.N internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.7 - Espessura Trabecular (Tb.Th)

A espessura trabecular (Tb.Th) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias ($p = 0,007$) (Figura 17 A). Houve diferença entre as superfícies nanoHA ($0,118 \pm 0,005$) e DAA ($0,110 \pm 0,005$) ($p = 0,032$) (Figura 17 B). Ao considerar a presença da L-PRF, não houve diferença entre sua presença ou ausência (Figura 17 C). Houve diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,007$) ao avaliar o tratamento de superfície com o uso de L-PRF (Figura 17 D). A avaliação dos dados em função da superfície do implante e do tempo demonstrou que houve diferença estatística para o grupo nanoHA ($0,124 \pm 0,007$) em relação ao grupo DAA ($0,114 \pm 0,007$) aos 7 dias ($p = 0,043$). Também houve diferença estatística significativa para a superfície DAA entre 7 e 30 dias ($p = 0,015$) (Figura 17 E). Ao avaliar a Tb.Th em função da L-PRF e do tempo, houve diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias ($p = 0,004$) para os animais sem o uso de L-PRF (Figura 17 F). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados mostram que houve diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias para o Grupo 4 (DAA + L-PRF) ($p = 0,038$). Entre o 7º e o 30º dias também houve diferença estatisticamente para o Grupo 1 (nanoHA) ($p = 0,008$). Aos 30 dias houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHa ($0,117 \pm 0,009$) e DAA ($0,099 \pm 0,009$) sem o uso de L-PRF ($p = 0,011$). Também observou-se, aos 30 dias, diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 (nanoHA) e 2 (nanoHA + L-PRF) ($p = 0,028$) (Figura 18).

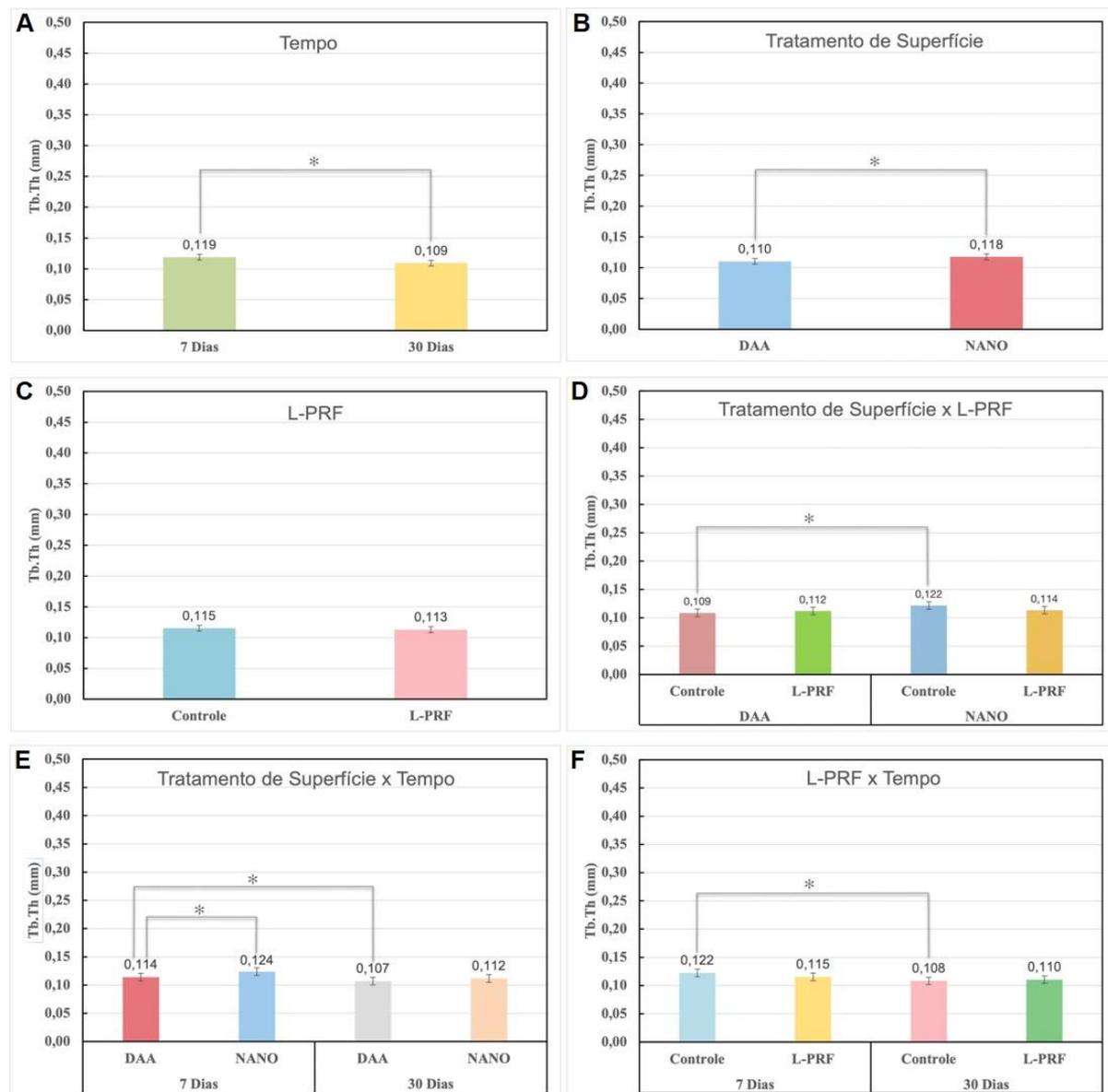


Figura 17. A-F. Gráficos representando a Tb.Th (mm) internamente às roscas dos implantes, organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tratamento de superfície e do tempo (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

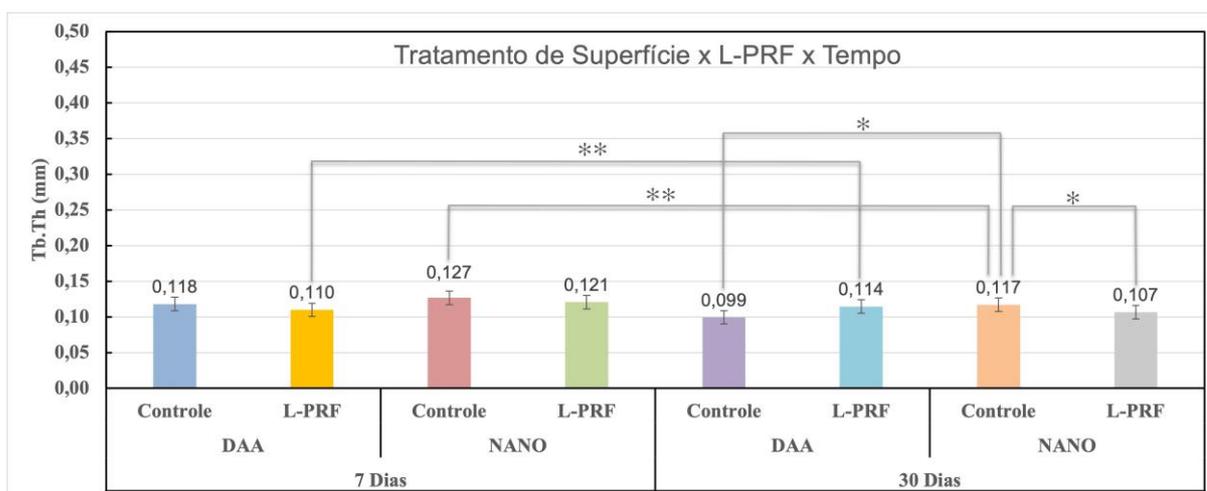


Figura 18. Gráfico representando a Tb.Th (mm) internamente às roscas quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tratamento de superfície, tempo e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.1.8 - Porosidade Total

A porcentagem de porosidade total (% Po.To) em função do tempo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias (Figura 19 A). Ao considerar a superfície do implante, a superfície nanoHA ($51 \pm 3,9$) exibiu menor % Po.To em relação à superfície DAA ($60 \pm 3,9$) ($p=0,002$) (Figura 11 B). Não houve diferença estatisticamente significativa quando a % Po.To foi avaliada em função da L-PRF ($p=0,798$) (Figura 19 C). Avaliando o tratamento de superfície e a presença ou não da L-PRF (Figura 19 D), os resultados evidenciaram que houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHA e DAA ($p=0,020$) tanto na ausência quanto na presença da L-PRF ($p=0,029$). Ao considerar o tempo e a superfície do implante, observou aos 7 dias diferença estatisticamente significativa entre as superfícies nanoHa ($50 \pm 5,6$) e DAA ($60 \pm 5,6$) ($p=0,022$). Aos 30 dias, também houve diferença estatisticamente significativa entre essas superfícies ($p=0,027$) (Figura 19 E). A % Po.To em função do tempo e da L-PRF não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 19 F). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 20).

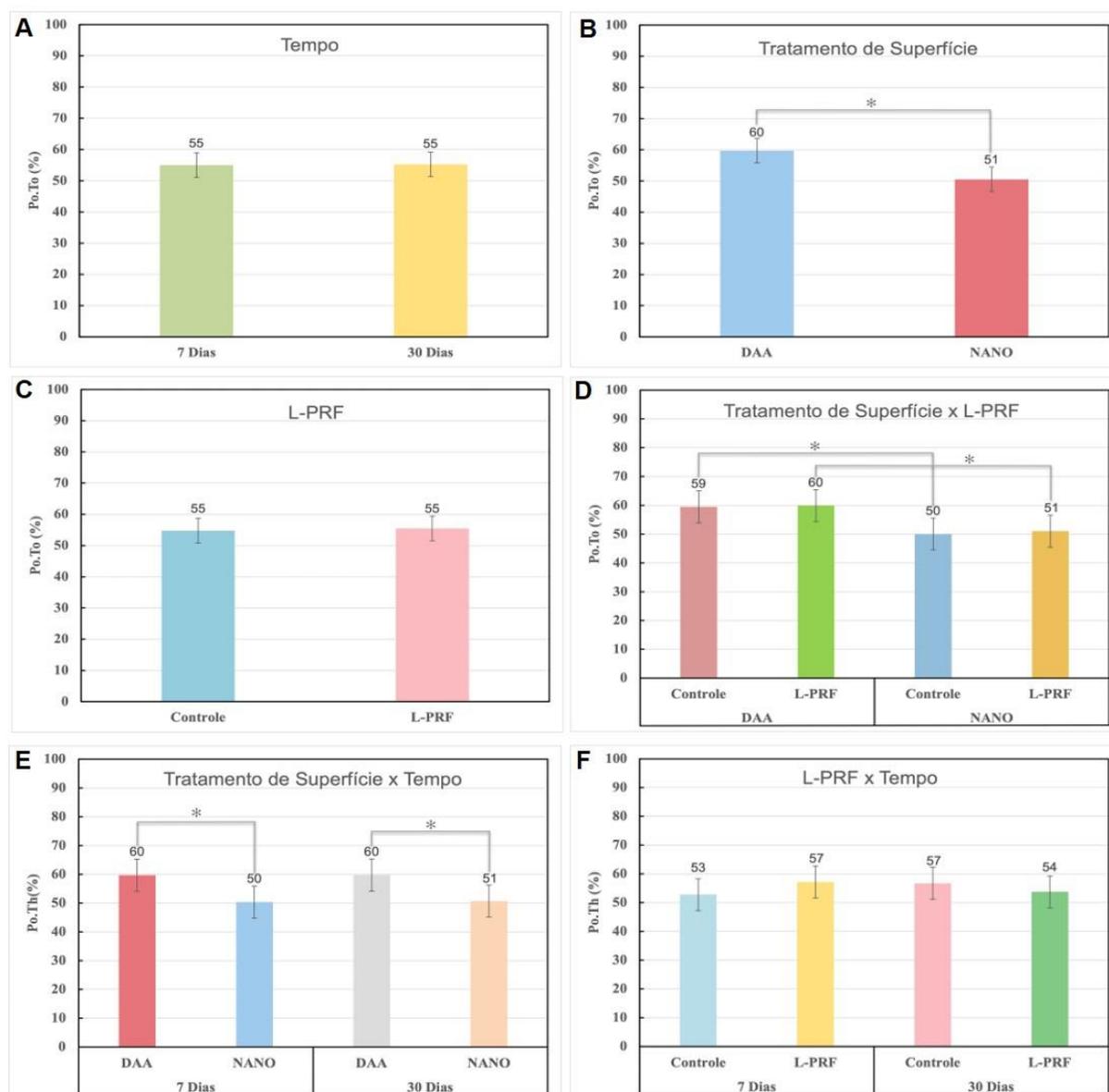


Figura 19. A-F. Gráficos representando % Po.To ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95%). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da presença da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tratamento de superfície e do tempo (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

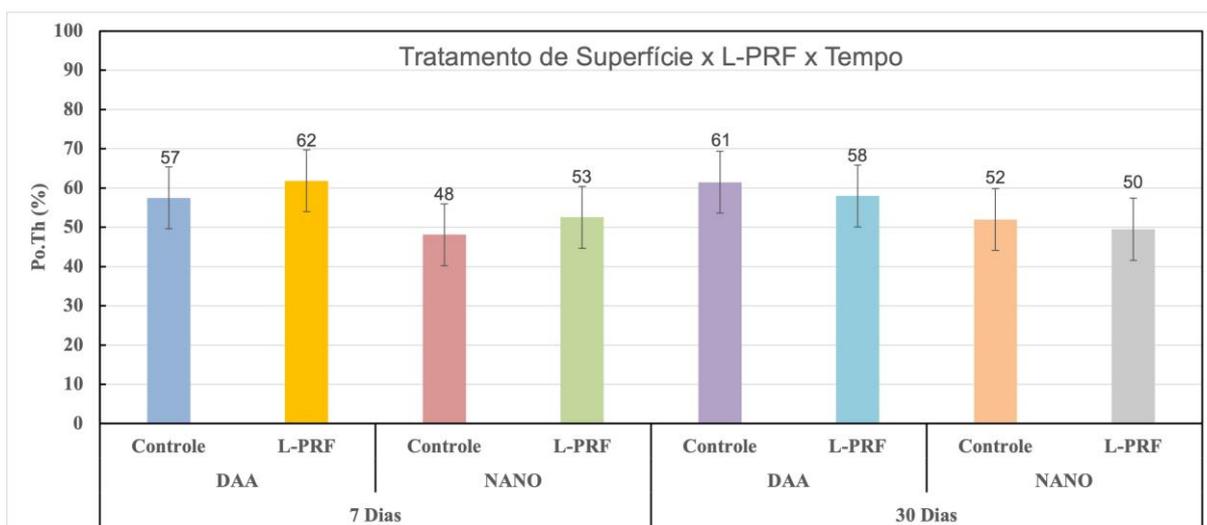


Figura 20. Gráfico representando % Po.To quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.2 - Resultados Histomorfométricos

Uma avaliação qualitativa das micrografias histológicas dos grupos é evidenciada na Figura 21 (A-H). Todas as imagens confirmam uma osseointegração bem-sucedida, independentemente do tempo, tratamento de superfície e da L-PRF. No geral, foi evidente a diferença observada entre 7 e 30 dias. Com relação ao tratamento de superfície, o grupo nanoHA apresentou maior densidade óssea quando comparado à superfície DAA.

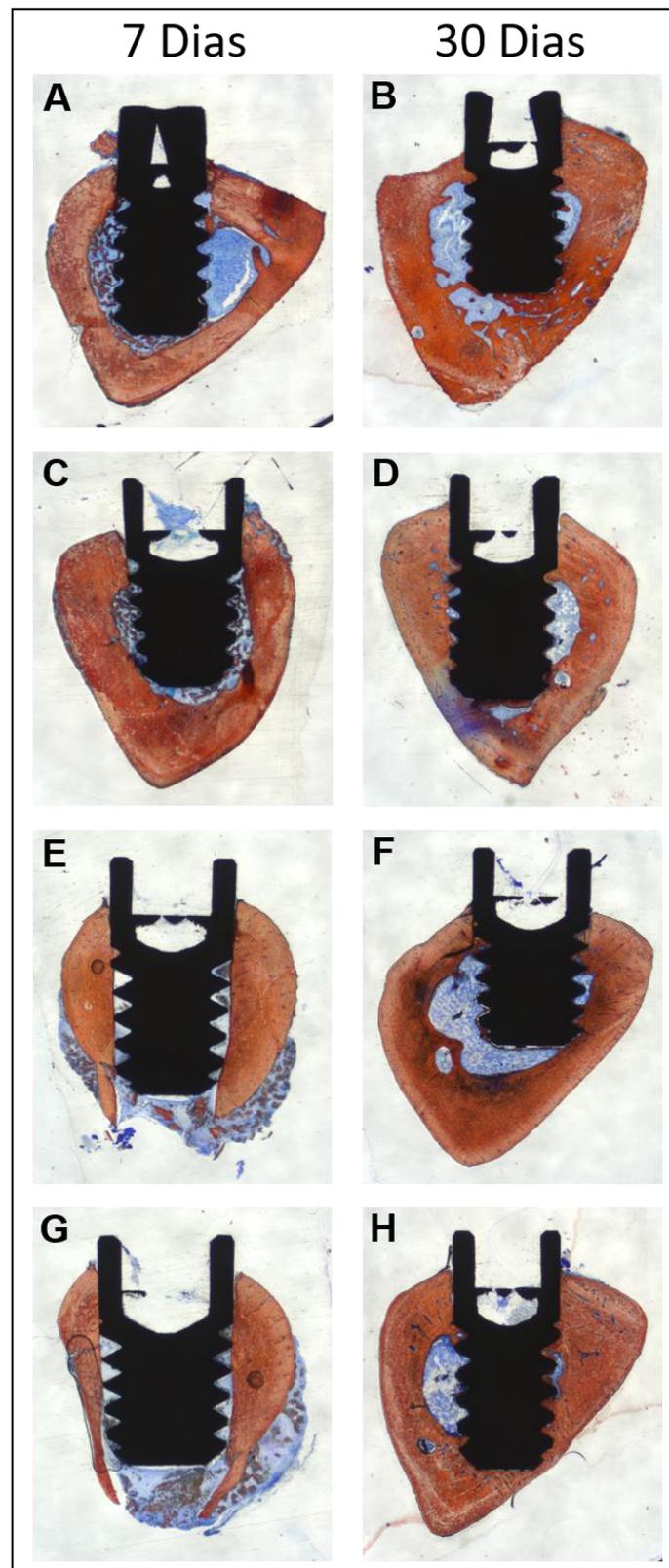


Figura 21. A-H. Imagens histológicas coradas com Stevenel's blue e Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais, nos períodos de 7 e 30 dias. Grupos nanoHA (A, B), nanoHA + L-PRF (C, D), DAA (E, F) e DAA + L-PRF (G, H).

4.2.1 - Contato osso implante (BIC)

As medidas histomorfométricas da porcentagem de contato osso-implante (% BIC) em função do tempo demonstraram diferença estatisticamente significativa entre 7 ($37,45 \pm 4,56$) e 30 ($52,82 \pm 4,56$) dias ($p=0,001$) (Figura 22 A). Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tratamento de superfície (Figura 22 B). A presença da L-PRF mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) (Figura 22 C). A avaliação dos dados em função da L-PRF e da superfície do implante (Figura 22 D) evidenciou superioridade com a presença da L-PRF, tanto para os implantes DAA ($p=0,037$) como para nanoHA ($p=0,001$). A avaliação dos dados em função do tempo e da superfície do implante evidenciou um aumento significativo para a superfície DAA entre 7 ($33,14 \pm 6,30$) e 30 dias ($54,65 \pm 6,30$) ($p=0,001$) (Figura 22 E). Quando a % BIC foi avaliada em função do tempo e da L-PRF (Figura 22 F), houve diferença estatística significativa ($p=0,006$) na ausência da L-PRF entre o 7º ($31,34 \pm 6,30$) e o 30º dias ($44,35 \pm 6,30$); com a utilização da L-PRF, também foi observada diferença estatisticamente significativa entre 7 ($43,57 \pm 6,30$) e 30 dias ($61,29 \pm 6,30$) ($p=0,001$). Aos 7 dias a presença da L-PRF mostrou superioridade ($43,57 \pm 6,30$) em relação aos grupos onde esta não esteve presente ($31,34 \pm 6,30$) ($p=0,010$). Aos 30 dias também se evidenciou superioridade na presença da L-PRF ($p=0,001$). Avaliando todos os fatores: tempo, tratamento de superfície e L-PRF (Figura 23), os resultados evidenciaram que O G3 apresentou diferença estatisticamente significativa entre o 7º e 30º dias ($p=0,002$). Entre os tempos de 7 ($37,31 \pm 8,90$) e 30 dias ($60,01 \pm 8,90$) também ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) para o grupo 4 (DAA + L-PRF). O grupo 2 (nanoHA + L-PRF), entre 7 ($49,82 \pm 8,90$) e 30 dias ($62,58 \pm 8,90$), também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,047$). Para a superfície nanoHA, houve diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2 nos tempos de 7 dias ($G1 = 33,70 \pm 8,90$; $G2 = 49,82 \pm 8,90$; $p=0,018$) e 30 dias ($G1 = 39,40 \pm 8,90$; $G2 = 62,58 \pm 8,90$; $p=0,001$).

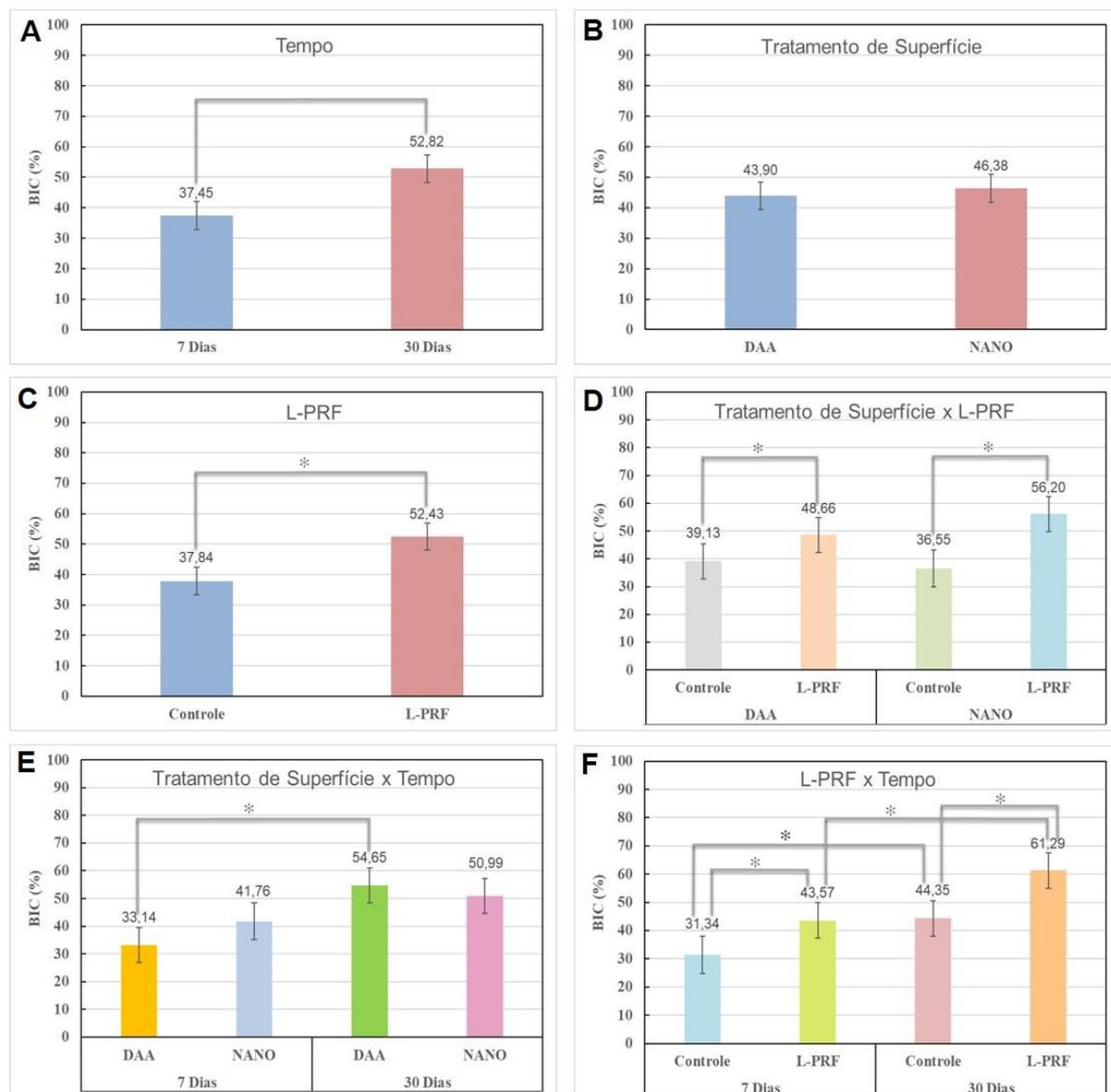


Figura 22. A-F. Gráficos representando a % BIC organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função da superfície (B). Em função da L-PRF (C). Em função da L-PRF e superfície (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função da L-PRF e do tempo (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

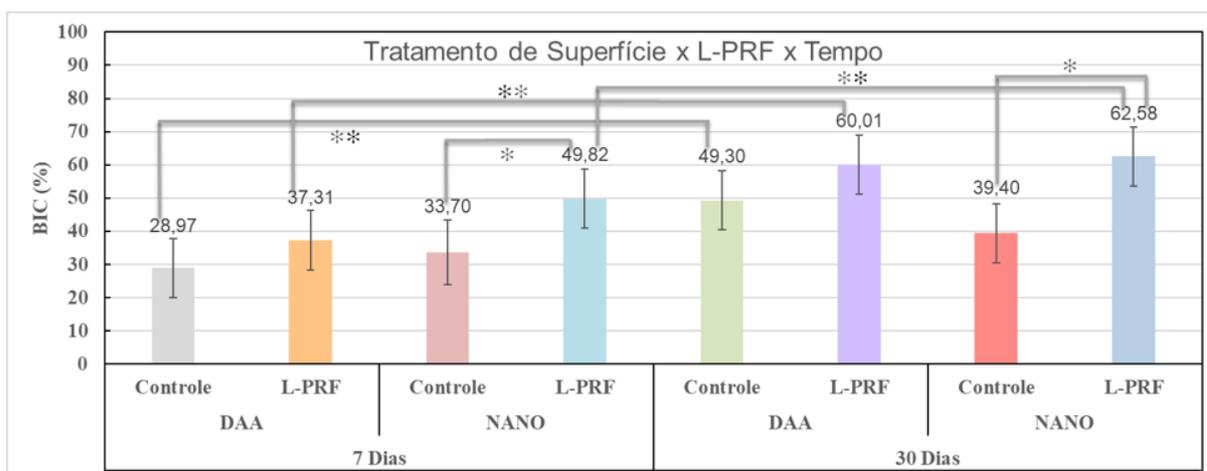


Figura 23. Gráfico representando a % BIC quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

4.2.2. Densidade óssea ao redor do implante (BAFO)

A porcentagem da densidade óssea ao redor do implante (% BAFO) em função do tempo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($46,25 \pm 4,80$) e 30 ($65,36 \pm 4,68$) dias ($p=0,001$) (Figura 24 A). Ao considerar a superfície do implante, o tratamento nanoHA ($63,56 \pm 4,80$) exibiu maior % BAFO em relação ao tratamento DAA ($48,05 \pm 4,68$) ($p=0,001$) (Figura 24 B). A presença da L-PRF (Figura 24 C) também exibiu maior % BAFO ($p=0,006$). A avaliação dos dados em função do tratamento de superfície do implante e da L-PRF (Figura 24 D), evidenciou uma superioridade da superfície nanoHA na presença da L-PRF ($72,84 \pm 6,62$) quando comparada com a sua ausência ($54,28 \pm 6,95$) ($p=0,001$); a superfície nanoHA + L-PRF mostrou também maior % BAFO ($72,84 \pm 6,62$) que a superfície DAA + L-PRF ($48,34 \pm 6,62$) ($p=0,001$). A análise do tempo e da superfície do implante (Figura 24 E) mostrou diferença estatisticamente significativa entre 7 ($33,40 \pm 6,60$) e 30 dias ($62,68 \pm 6,60$) ($p=0,001$) para a superfície DAA. Aos 7 dias também houve diferença estatisticamente significativa as superfícies nanoHA ($59,09 \pm 6,60$) e DAA ($33,40 \pm 6,60$) ($p=0,001$). A análise do tempo e presença ou não da L-PRF (Figura 24 F) mostrou diferença estatisticamente significativa na ausência da L-PRF entre 7 ($44,09 \pm 6,90$) e 30 dias ($57,93 \pm 6,60$) ($p=0,006$); entre 7 ($48,40 \pm 6,60$) e 30 dias ($72,78 \pm 6,60$) também houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) na presença da L-PRF. Aos 30 dias a presença da L-PRF mostrou maior % BAFO ($72,78 \pm 6,60$) em relação à sua

ausência ($57,93 \pm 6,60$) ($p=0,003$). Avaliando todos os fatores (tempo, tratamento de superfície e L-PRF), os resultados evidenciaram que no grupo 3 (DAA) houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) entre 7 ($37,08 \pm 9,36$) e 30 dias ($58,43 \pm 9,36$). Neste mesmo intervalo de tempo, também houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) para o grupo 4 (DAA + L-PRF). Aos 7 dias ($29,73 \pm 9,36$) e aos 30 dias ($66,95 \pm 9,36$). Aos 7 dias houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos 1 ($51,11 \pm 9,36$) e 3 ($51,11 \pm 10,26$) ($p=0,048$), entre os grupos 1 ($51,11 \pm 9,36$) e 2 ($67,08 \pm 9,36$) ($p=0,025$), bem como entre os grupos 2 ($67,08 \pm 9,36$) e 4 ($29,73 \pm 9,36$) ($p=0,001$). Aos 30 dias, entre os grupos 1 ($57,44 \pm 9,36$) e 2 ($78,61 \pm 9,36$), também houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) (Figura 25).

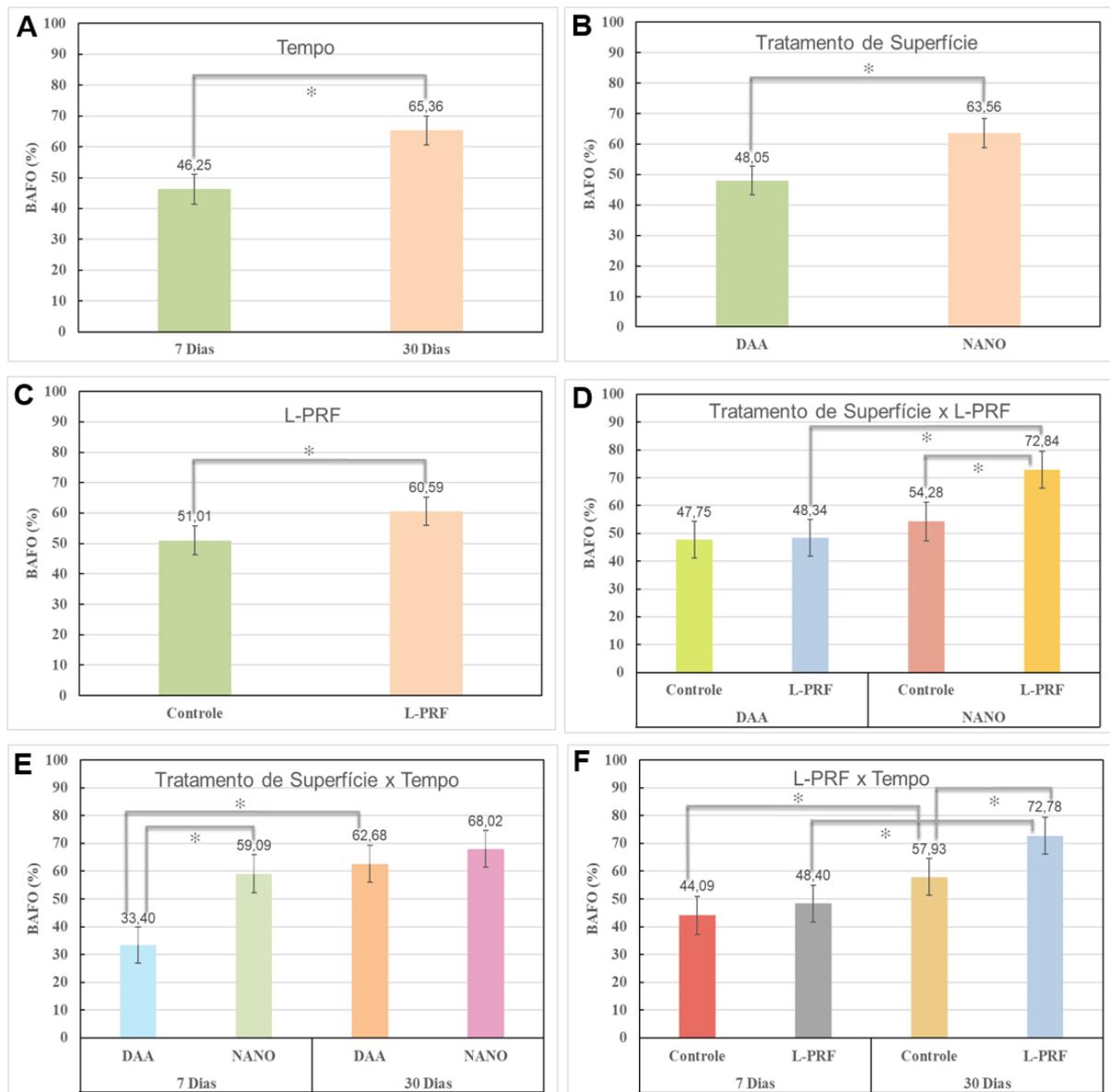


Figura 24. A-F. Gráficos representando a % BAFO ao redor do implante organizados diferentemente em função dos fatores do estudo (média e IC 95 %). Dados em função do tempo (A). Em função do tratamento de superfície (B). Em função da L-PRF (C). Em função do tratamento de superfície e L-PRF (D). Em função do tempo e da superfície do implante (E). Em função do tempo e da L-PRF (F). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

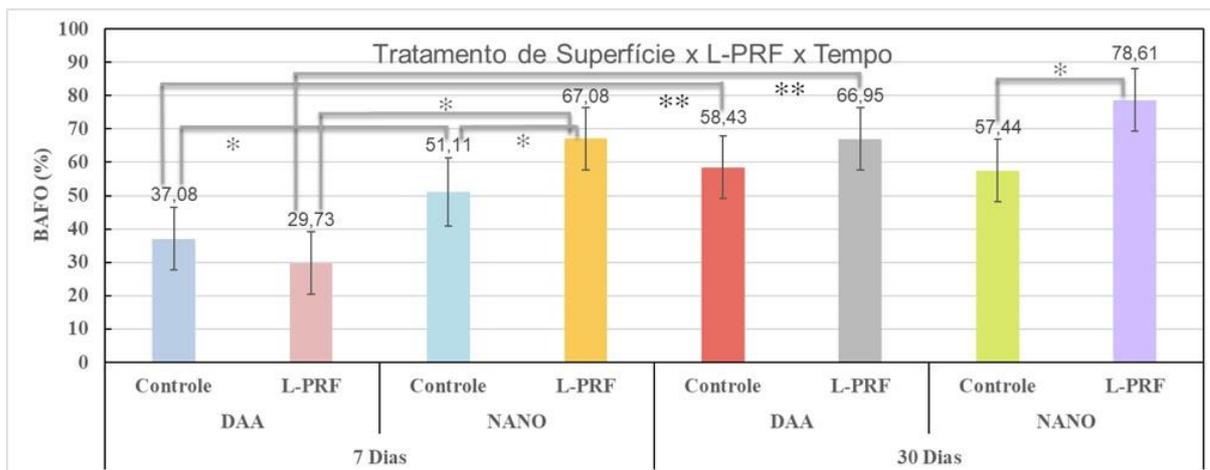


Figura 25. Gráfico representando a % BAFO ao redor do implante quando todos os dados se apresentam de forma colapsada (tempo, tratamento de superfície e L-PRF) (média e IC 95 %). * = diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p < 0,05$); ** = diferença estatisticamente significativa intragrupos ($p < 0,05$).

Discussão

5. Discussão

Há décadas a utilização dos implantes dentários tem sido uma ferramenta de extrema relevância nas reabilitações orais. Modificações na microtopografia e na superfície dos implantes, bem como o uso da Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), são estratégias que têm sido utilizadas para promover um melhor e mais rápido contato entre o osso e o implante. O presente trabalho avaliou, em um modelo experimental *in vivo*, uma superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em escala nanométrica associada ou ao não à L-PRF.

A metodologia utilizada neste trabalho buscou elucidar as seguintes questões: 1) A superfície do implante modificada com adição de nanohidroxiapatita pode apresentar melhores resultados? 2) Como essa superfície com adição de nanohidroxiapatita se comporta no quesito contato osso-implante e densidade óssea ao redor dos implantes? 3) A associação da fibrina rica em plaquetas e leucócitos resulta em melhora dos parâmetros de avaliação óssea?

Foi observado que os implantes com o revestimento nanoHA exibiram maior porcentagem de contato tridimensional osso-implante (% IS/TS) em relação à superfície DAA. Esses resultados estão em concordância com outros estudos que demonstraram que modificações na superfície em escala nanométrica favorecem a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Jiang et al. 2017). Além disso, os resultados do presente estudo concordam com publicação que avaliou, em metodologia semelhante, o uso desta superfície em animais saudáveis e diabéticos (Oliveira et., 2019). Quando se associou a L-PRF às duas superfícies de implantes, houve aumento estatisticamente significativo entre 7 e 30 dias. Um outro achado importante foi que os efeitos na IS/TS do uso da L-PRF foram estatisticamente superiores ($p=0,009$) na superfície nanoHA ($63,56 \pm 7,30$) em relação à superfície DAA ($49,43 \pm 7,30$). Em uma revisão sistemática em humanos, Castro et al., 2017, relataram que a associação da L-PRF à cirurgias de implantes beneficia a regeneração óssea. Nesse contexto, é pode ser interessante a utilização de uma superfície que atue sinergicamente, maximizando o potencial biológico do agregado plaquetário.

Ao se considerar isoladamente a superfície do implante, a superfície nanoHA exibiu, com diferença estatisticamente significativa, maior densidade óssea tridimensional (BV/TV %) em relação à superfície DAA. Esse resultado corrobora

dados da literatura que observaram que a nanoestrutura aplicada a biomateriais proporciona maior grau de osseointegração (Ellingsen et al., 2004; Meirelles et al., 2008; Souza et al., 2018; Oliveira et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Maior porcentagem de densidade óssea tridimensional (BV/TV %) e maior relação da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV) foram observadas quando se avaliou o tratamento de superfície em relação à utilização ou não da L-PRF. A superfície nanoHA foi estatisticamente superior à superfície DAA tanto na presença quanto na ausência da L-PRF. Esses resultados concordam com os achados de Ajami et al., 2014, que estudaram a osseointegração em modelo de ratos diabéticos, e também com os resultados de Liu et al., 2016 e de Faverani et al., 2018, que avaliaram a osseointegração em ratos osteoporóticos. Os três trabalhos concluíram que a osseointegração comprometida do implante, pelas características de reparo ósseo deficiente dos animais, foi minimizada pela adição de características nanotopográficas a uma superfície subjacente de implantes microtopograficamente complexa. Além disso, Strauss et al. (2018) demonstraram que a L-PRF pode ter benefício nas fases iniciais da osseointegração, ratificando o que foi observado no presente estudo.

Os resultados da porcentagem de separação trabecular (Tb.Sp) e o número de trabéculas (Tb.N) também revelaram diferenças estatísticas favorecendo a superfície nanoHA. Ao se comparar o tratamento de superfície em presença ou ausência da L-PRF, houve diferença estatisticamente significante favorecendo a superfície nanoHA + L-PRF, sugerindo que tais modificações da superfície associadas à L-PRF favorecem o processo de osseointegração. Em 2020, Canellas e colaboradores, em um trabalho clínico controlado em humanos, mostraram fortes evidências dos efeitos benéficos da L-PRF tanto na preservação do rebordo alveolar quanto na formação óssea.

A espessura trabecular e a porcentagem de porosidade total mostraram resultados estatisticamente significantes que favoreceram a superfície nanoHA. Quando em presença da L-PRF, a superfície nanoHA também apresentou os melhores resultados. Dados da literatura mostraram que superfícies química e topograficamente complexas, como implantes revestidos com nano-hidroxiapatita, proporcionaram um arranjo mais adequado, que melhor mimetiza a organização natural do tecido ósseo e facilita a interação com as biomoléculas dos tecidos e comunicação célula-célula durante o processo de cicatrização (Hayashi et al. 2012; Tomsia et al. 2013; Webster & Ahn 2007). No presente estudo, a associação da superfície nanoHa à L-PRF, intensificou o processo de cicatrização óssea no modelo utilizado. Neiva e colaboradores (2016) em

um estudo em cães, também encontraram, um efeito sinérgico entre implantes com revestimento em escala nanométrica e a L-PRF, a qual aumentou a formação óssea em implantes imediatos.

Nas análises histomorfométricas a superfície nanoHa + L-PRF apresentou maiores % BIC e % BAFO quando comparada com a superfície DAA + L-PRF, com diferenças estatisticamente significantes. A literatura tem mostrado que a superfície topográfica dos implantes desempenha papel central nos estágios iniciais do contato osso-implante, sendo que a formação óssea peri-implantar depende da capacidade de cicatrização óssea (Wenneberg & Albrektsson, 2009). Outras estratégias para reduzir o tempo de osseointegração atuam na modulação da resposta cicatricial do hospedeiro após a colocação do implante. O uso de L-PRF, por atrair células mesenquimais indiferenciadas para o local da injúria, favorece a angiogênese, a quimiotaxia e proliferação celulares, acelerando o processo de cicatrização e osseointegração (Dohan et al., 2012). Öncü e colaboradores (2016), em um modelo experimental usando coelhos, avaliaram se a L-PRF favorece a osseointegração e o contato osso-implante. Os autores observaram maior porcentagem de contato osso-implante no grupo onde se utilizou a L-PRF, concluindo que a L-PRF exerce um efeito positivo sobre a cicatrização e regeneração ósseas, resultados que concordam com os obtidos no presente estudo para a superfície nanoHA. Em um estudo em cães, Neiva e colaboradores, em 2016, utilizando a medida da porcentagem da fração ocupada pela área óssea (BAFO) também concluíram que a associação de implantes com superfície texturizada em escala nanométrica à L-PRF aumenta a formação óssea ao redor de implantes imediatos após exodontia.

No presente estudo, as dimensões do preparo ósseo para a instalação do implante no modelo utilizado, indicavam que ao final do tempo experimental haveria osseointegração em todos os grupos. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos quando se associou a superfície nanoHA à L-PRF, evidenciando o potencial benéfico da utilização da L-PRF. Esse dado vai ao encontro de diversos relatos na literatura (Öncü et al., 2016; Neiva et al., 2016; Strauss et al., 2018) que descreveram que a utilização da L-PRF favorece, de diversas maneiras, o processo de osseointegração e, conseqüentemente, diminui o tempo de reabilitação, podendo influenciar na sobrevivência do implante. Cho e colaboradores, em 2014, em um estudo em coelhos, utilizando o ensaio de torque de remoção, observaram que a utilização da L-PRF acelerou a

integração óssea dos implantes no período inicial da cicatrização após a criação dos defeitos ósseos nas tíbias. No presente estudo este achado também esteve presente nos grupos com a superfície nanoHA, nos quais tanto BIC quanto BAFO foram estatisticamente superiores no período de 7 dias quando houve o uso concomitante de L-PRF.

Em uma revisão sistemática, Castro e colaboradores (2017) mostraram que a L-PRF teve efeito positivo na regeneração óssea em cirurgias de elevação de seio maxilar, na manutenção do rebordo alveolar e na osseointegração ao redor dos implantes dentários. Adicionalmente, aos efeitos positivos na cicatrização e formação óssea, Castro e colaboradores (2019), relataram o efeito da L-PRF contra patógenos periodontais, especialmente *Porphyromonas gingivalis*. Schuldt et al (2020) mostraram o papel anti-microbiano da L-PRF quando utilizada em superfícies rugosas de implantes infectadas pelo biofilme. Os dois principais componentes celulares da L-PRF, leucócitos e plaquetas, possuem importante papel na defesa do hospedeiro. Embora este efeito não tenha sido um objeto de análise do presente estudo, que utilizou um modelo de instalação do implante sem contato com o meio externo, este tipo de achado é de bastante importância para a rotina clínica, devendo ser investigado em estudos futuros.

Lyris et al (2021), em uma revisão sistemática e meta-análise, avaliaram os efeitos da L-PRF na estabilidade dos implantes dentários. Os autores concluíram que a L-PRF possui um efeito positivo sobre a estabilidade óssea secundária (biológica) e que sua utilização clínica pode ajudar a reduzir o tempo de cicatrização óssea. Estes resultados concordam com os achados do presente estudo, principalmente em relação à superfície nanoHA, que mostrou diferenças significativas entre os grupos com e sem L-PRF logo precocemente, no tempo de 7 dias.

O modelo experimental utilizado no presente estudo prescinde do uso de L-PRF para que haja a osseointegração. Entretanto, proporcionou um preparo ósseo padronizado que permitiu avaliar as diferenças entre os grupos experimentais e a quantificação do efeito das superfícies e do uso de L-PRF no contato osso-implante e na densidade óssea do osso neoformado no interior das roscas, parâmetros clinicamente relevantes. Desse modo, sugere-se, a partir dos resultados aqui obtidos, a avaliação do comportamento da superfície nanoHA em associação à L-PRF tanto em estudos pré-clínicos em animais, quanto clínicos em humanos, envolvendo a instalação de implantes associada a defeitos ósseos e/ou situações clínicas desafiadoras, como implantes

imediatos, fenestração pós-instalação do implante, reconstruções de rebordo, dentre outras.

Conclusão

6. Conclusão

Dentro das limitações do presente estudo, os resultados encontrados demonstraram que:

- a) Os implantes recobertos com nanoHA apresentaram melhores resultados de reparo ósseo periimplantar em avaliações microtomográfica e histomorfométrica, quando comparados à superfície DAA;
- b) Os implantes recobertos com nanoHA, quando associados à L-PRF, promoveram um aumento significativo do processo de reparo ósseo ao redor de implantes, evidenciado principalmente por maior densidade óssea ao redor destes, sugerindo que tais modificações da superfície associadas ao concentrado plaquetário favorecem a neoformação óssea. Tal efeito foi superior na superfície nanoHA em comparação à superfície DAA

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

AJAMI, E. et al . Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. **Acta Biomater**, v. 10, n. 1, p. 394-405, Jan 2014.

ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. (a). Oral implant surfaces: Part 1—Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **Int J Prosthodont**, v. 20, n. 17, p. 536-43, Set 2004.

ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. (b). Oral implant surfaces: Part 2—Review focusing on clinical knowledge of different surfaces. **Int J Prosthodont**, v. 17, n. 5, p. 544-64, Set 2004.

BRACERAS, I. et al. In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 3, p. 274-78, Mar 2009.

BRANEMARK, P. I. et al. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 3, n. 2, p. 81–100, Jan 1969.

CANELLAS, J. V. S. et al. Tomographic and histomorphometric evaluation of socket healing after tooth extraction using leukocyte-and platelet-rich fibrin: A randomized, single-blind, controlled clinical trial. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 48, n. 1, p. 24-32, Jan 2020.

CASTRO, A. B. et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 2, p. 225-34, Fev 2017.

CASTRO, A. B. et al. Antimicrobial capacity of leucocyte-and platelet rich fibrin against periodontal pathogens. **Sci Rep**, v.9, n. 1, p. 81-88, Jun 2019.

CHAMBRONE, L.; CHAMBRONE, L. A.; LIMA, L. A. Effects of occlusal overload on periimplant tissue health: a systematic review of animal model studies. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 10, p. 1367-78, Out 2010.

CHO, S. A. et al. The bone integration effects of platelet-rich fibrin by removal torque of titanium screw in rabbit tibia. **Plateles**, v. 25, n. 8, p. 562-66, Jan 2014.

COELHO, P. G. et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 88, n. 2, p. 579-96, Fev 2009.

DE LA ROSA, G. M. et al. Predictors of peri-implant bone loss during long-term maintenance of patients treated with 10 mm implants and single crowns restorations. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 28, n. 3, p. 798-802, Maio 2013.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 51-55, Mar 2006.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 7, p. 1145-52, Jun 2012.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 158-67, Mar 2009.

ELIAS, C. N.; MEIRELLES, L. Improving osseointegration of dental implants. **Expert Rev Med Devices**, v. 7, n. 2, p. 241-56, Mar 2010.

ELLINGSEN, J. E. et al. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19, n. 5, p. 659-66, Set 2004.

FAVERANI, L. P. et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clin Oral Investig**, v. 22, n. 1, p. 255-65, Jan 2018.

GONZÁLEZ-GARCÍA, R.; MONJE, F. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-CT. **Clin. Oral Impl Res**, v. 24, n. 8, p. 871-79, Ago 2013.

HAYASHI, M. et al. In vitro characterization and osteoblast responses to nanostructured photocatalytic TiO₂ coated surfaces. **Acta Biomater**, v. 8, n. 6, p. 2411-16, Jul 2012.

HONG, B. et al. Bone regeneration with umbilical cord blood mesenchymal stem cells in femoral defects of ovariectomized rats. **Osteoporosis and Sarcopenia**, v. 4, n. 3, p. 95-101, Set 2018.

HU, Z. et al. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 1, p. 43-48, Jan 2009.

KLOKKEVOLD, P. R. et al. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study. **Clin. Oral Implants Res**, v. 8, n. 6, p. 442-47, Dez 1997.

LIU, X. et al. Study of a new bone-targeting titanium implant-bone interface. **Int J Nanomedicine**, v. 25, n. 11, p. 6307-24, Nov 2016.

LIU, Y.; DE GROOT, K.; HUNZIKER, E. B. Osteoinductive implants: The mise-en-scene for drug-bearing biomimetic coatings. **Ann Biomed Eng**, v. 32, n. 3, p. 398-406, Mar 2004.

LYRIS, V. et al. Effect of leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) on stability of dental implants. A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, n. 10, p. 1130-39, Dez 2021.

MARTINEZ, E. F. et al. Evaluation of a titanium surface treated with hydroxyapatite nanocrystals on osteoblastic cell behavior: An in vitro study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 33, n. 3, p. 597-602, Maio 2018.

MEIRELLES, L. et al. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. **J Biomed Mater Res**, v. 87, n. 2, p. 299-307, Nov 2008.

MIRON, R. J. et al. Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin. **J Periodontol.**, v. 90, n. 8, p. 817-820, Ago 2019.

NEIVA, R. et al. The Synergistic Effect of Leukocyte Platelet-Rich Fibrin and Micrometer/Nanometer Surface Texturing on Bone Healing around Immediately Placed

Implants: An Experimental Study in Dogs. **BioMed Research International.**, v. 2016, p. 1-9, Nov 2016.

OLIVEIRA, P. G. F. P. et al. Histological and Nanomechanical Properties of a New Nanometric Hydroxiapatite Implant Surface. An In Vivo Study in Diabetic Rats. **Materials**, v. 13, n. 24, p. 1-17, Dez 2020.

OLIVEIRA, P. G. F. P. et al. Influence of nano-hydroxyapatite coating implants on gene expression of osteogenic markers and micro-CT parameters. An in vivo study in diabetic rats. **J Biomed Mater Res A.**, v. 109, n. 5, p. 682-694, Maio 2021.

ÖNCÜ, E. et al. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 21, n. 5, p. 601-07, Set 2016.

PARK, H. S.; LEE, Y. J.; KWON, T. G. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and the mandible. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v, 133, n. 1, p. 30-37, Jan 2008.

PEREIRA, A. C. et al. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. **Arq Bras Cardiol.**, v. 88, n. 1, p. 104-09, Jan 2007.

PICHOTANO, E. C. et al. Evaluation of L-PRF combined with deproteinized bovine bone mineral for early implant placement after maxillary sinus augmentation: A randomized clinical trial. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 21, n. 2, p. 253-62, Abr 2019.

RAUNER, M. et al. The HLA-B27 transgenic rat, a model of spondyloarthritis, has decreased bone mineral density and increased RANKL to osteoprotegerin mRNA ratio. **J Rheumatol**, v. 36, n. 1, p. 120-26, Jan 2009.

SCHULDT, L. et al. Decontamination of rough implant surfaces colonized by multispecies oral biofilm by application of leukocyte and platelet rich fibrin. **Journal of Periodontol**, v. 92, n. 6, p. 875-885, Jun 2021.

SOUZA, A. T. P. et al. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 10, p. 8441-49, Nov 2018.

TABRIZI, R.; ARABION, H.; KARAGAH, T. Does platelet-rich fibrin increase the stability of implants in the posterior of the maxilla? A split-mouth randomized clinical trial. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 5, p. 672-75, Maio 2018.

TOMSIA, A. P. et al. Nanotechnology for dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 6, p. 535-46, Nov-Dez 2013.

WEBSTER, T. J.; AHN, E. S. Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 103, p. 275-308, 2007.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. Suppl 4, p. 172-84, Set 2009.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. On implant surfaces: A review of current knowledge and opinions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, n. 1, p. 63-74, Jan-Fev 2010.

Anexos

8. Anexos

Anexo 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small>  <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação de uma nova superfície de implante recoberta por hidroxiapatita em esclerótica nanométrica associada ao uso de L-PRF. Estudo in vivo em modelo ósseo deficiente**”, Protocolo nº 2018.1.164.58.4, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 18/04/2018.

Vigência do Projeto	19/04/2018 a 19/04/2019
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	108
Peso/Idade	200-250 g/ 7 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.



Prof. Dr. Michel Reis Messor

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais