



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Luiz Guilherme Fiorin

***“Influência do tamoxifeno na remodelação
óssea periimplantar”***

ARAÇATUBA – SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Luiz Guilherme Fiorin

***“Influência do tamoxifeno na remodelação
óssea periimplantar”***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Períodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

ARAÇATUBA – SP
2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F521i Fiorin, Luiz Guilherme.
Influência do Tamoxifeno na remodelação óssea periimplantar / Luiz Guilherme Fiorin. - Araçatuba, 2019
97 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida

1. Implantes dentários 2. Ósseointegração 3. Tamoxifeno
4. Modelos animais 5. Neoplasias da mama I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados curriculares

Luiz Guilherme Fiorin

Nascimento: 04 de Abril de 1994 - São Paulo - SP

Filiação: Silvia Cristina Marques Fiorin
Luciano Fiorin

2012-2017: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” –
Faculdade De Odontologia de Araçatuba

2017-2019 Curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, nível de
Mestrado acadêmico, na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade
De Odontologia de Araçatuba

Dedicatória



“Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais.”

Padre Fábio de Melo

A Deus

*Ofereço esta conquista a Deus, por ser porto seguro em algumas partes
dessa jornada, pelo apoio nos momentos difíceis e segurança nos
momentos tranquilos.*

*Apesar da distância nos últimos anos, nunca me abandonou em momento
nenhum da minha trajetória.*

*“Senhor, faça com que eu não procure tanto...
...aonde há tristeza que eu leve alegria”*

Prece Simples – São Francisco

À minha família

A minha mãe **Silvia** e meu Pai **Luciano**,

Por me proporcionar todo suporte necessário para a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Assim como a possibilidade de me dedicar a aprender e da realização de mais um sonho.

Muito obrigado por todo apoio.

Ao Meu Irmão **Juninho**,

Que apesar da distancia esteve presente em todos os passos da minha vida adulta, desde o ingresso na faculdade até a defesa do meu mestrado.

Obrigado por fazer o que esteve ao seu alcance por mim e sabe que sempre fiz o mesmo.

Aos meus **primos, primas, tios, tias, avó e avô**

Agradeço todo o apoio a distância, os compromissos nunca impediram de se fazerem presente apoiarem tanto a mim, quanto a minha família quando precisamos

À todos peço desculpas pelos momentos de ausência

Amo vocês.

Agradecimentos Especiais



“Amigos são a família que nos permitiram escolher.”

Jess C. Scott

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, pela oportunidade da realização do mestrado sob sua orientação, pela paciência enquanto eu amadurecia de estudante de graduação para pesquisador e adulto, pela amizade em todos os anos na periodontia, pela oportunidade de conhecer novas culturas, de me aperfeiçoar sempre e pela confiança depositada em mim e na minha capacidade. Desde os meus dias de graduação o senhor é um modelo para mim e almejo um dia ter uma parte da dedicação aos alunos e orientados que vejo no senhor.

À Prof.^a Claudia Dellavia, Por me receber de braços abertos em seu laboratório. Exemplo de professora e pesquisadora, prática, objetiva e extremamente competente. Sua ética em relação a pesquisa é invejável, de uma maneira boa. Obrigado pelo convívio agradável e pelo apoio no período que passei na Italia.

Ao Prof. Dr. Carlo Maiorana, agradeço por todo apoio quando me aventurei em terras desconhecidas, por me proporcionar a experiência única de acompanhar o seu trabalho no departamento de implantodontia, agradeço pela gentileza, compreensão e amizade. Espero que possamos nos encontrar novamente

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino, pela disponibilidade que teve para me auxiliar na conclusão do mestrado, pela compreensão e pela paciência, que por vezes deixou sua casa em seu período de descanso para me ajudar. Agradeço pelas aulas que pude assistir do senhor, aulas que desde o primeiro ano da graduação admiro, me encantam pelo amor à ensinar e levo como modelo.

À Professora Dra. Maria José Hitomi Nagata Agradeço pela oportunidade de convívio com alguém tão competente e dedicada ao ensino e à pesquisa. As conversas com a senhora são sempre muito produtivas em todos os aspectos. Ter exemplos como a senhora são de extrema relevância para nosso caminho na pós-graduação e perspectivas de futuro. Obrigado por cada conversa, cada ensinamento, conselho ou exemplo que tenho o prazer da senhora compartilhar comigo.

À Professora Dra. Letícia Helena Theodoro Obrigado por ter feito parte da minha formação tanto na graduação como no mestrado. Sempre muito atenciosa, educada e acessível, transmitindo todo o conhecimento que possui para nós, alunos.

À minha namorada e amiga Lorena, pelo companheirismo, confiança e apoio. Pelos momentos alegres que pudemos compartilhar, pelas risadas, pelo crescimento que tivemos juntos e sobretudo pela insistência em me fazer uma pessoa melhor todo dia. Por ouvir as minhas idéias e principalmente pela sinceridade. Obrigado por estar presente na minha vida

À amiga e professora Vivian, pela importância da sua contribuição nas minhas realizações pessoais e profissionais. Obrigado pela paciência, parceria e pelos ensinamentos. Trabalhar com você é sempre uma honra pra mim e ter você como minha avaliadora só me deixa mais feliz por podermos dividir mais um desses momentos alegres. Posso dizer tranquilamente que se cheguei mais longe hoje foi por causa de sua ajuda.

Às amigas e professoras Natalia e Paula, gostaria de agradecer pela companhia agradável, pela amizade, pela gentileza e pela confiança para auxiliar nos seus projetos, que nunca foram trabalho pra mim e sim um prazer, obrigado por me ajudarem sempre e pelos conselhos em momento de necessidade.

Ao amigo Henrique Rinaldi Matheus, sou grato por todos os ensinamentos e pela disponibilidade em me ajudar, fico feliz de ter trilhado essa jornada em sua companhia, obrigado por me ensinar o que eu sei de laboratório, pela paciência com que me ajudou, que foi testada diversas vezes pelas piadas sem graça, obrigado pelos conselhos e pela parceria. Sua ajuda foi diretamente responsável pela minha defesa do mestrado e fico muito feliz com o seu sucesso, que sei que virá fácil por causa do seu brilhantismo.

Aos amigos Breno, David e Nathália, minha família da periodontia, agradeço pela amizade e pela disponibilidade de me ajudar sempre que precisei desde o começo da minha caminhada no mestrado, pelas risadas, pelas vezes que saímos juntos e peço desculpas nos momentos de ausência, mas sei que posso confiar em vocês de olhos fechados .

Aos Alunos de iniciação científica e monitoria Clara, Giovani, Bianca, Elisa Agradeço pelos momentos que precisei e vocês sempre estiveram disponíveis para ajudar. Sou muito grato por esse companheirismo e desejo tudo de melhor à vocês, sempre que precisarem estarei aqui.

Aos meus amigos Ana Flávia, Gabriel, Thales, Luis e Moacir, agradeço pela amizade, pela parceria, pelos conselhos em momentos ruins e risadas em momentos felizes, nossos laços de amizade se estenderam a muito tempo para laços familiares.

Aos queridos amigos da pós-graduação, Marta, Marina, Mariana, Ana, Beatriz agradeço pelo carinho e agradável convívio!

*Aos Amigos que fiz no departamento de Anatomia da universidade de Milão, **Elena, Gaia, Dola, Mariachiara, Giacomo***

*Aos amigos do Departamento de Implantodontia do Hospital Maggiori de Milão, **Pier, Fabrizio, Giulia, Anand***

Ao Professor **Wilson Roberto Poi**, obrigado pela oportunidade da realização de um sonho, pela confiança em mim depositada e pelo companheirismo.

À todos os professores do mestrado,

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

À todos os colegas do mestrado,

Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada neste período.

Agradecimentos



“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”
Willian Shakespeare

À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor, Prof. Glauco Issamu Miyahara, e Vice-Diretor, Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. André Luiz Fraga Briso, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação e lutar para termos o melhor curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de MESTRADO (CAPES-DS; 01/10/2017 - 28/02/2018), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), também pela concessão de bolsa de mestrado (processo 2017/11688-4; 01/04/2018 a 01/02/2020).

Aos Professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, pela dedicação e ensinamentos que me proporcionam no curso.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Renato, Paulo e Marco, que sempre estiveram dispostos a dar o melhor. Os meus sinceros agradecimentos e admiração.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba, obrigado pela colaboração, ensinamentos e por fazer a “nossa” Biblioteca um lugar agradável e alegre.

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação, Valéria, Cristiane e Lilian, pela paciência, ajuda e estarem sempre disponíveis.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Odontologia Infantil e Social.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica
Clínica.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e
Prótese.

Aos funcionários do Biotério, Camilo e João,.

Aos funcionários da Seção de Materiais.

Aos funcionários da Seção de Divisão Técnica Acadêmica.

Aos funcionários da Seção de Divisão Técnica Administrativa.

Aos funcionários da Seção de Diretoria de Atividades Auxiliares. Aos funcionários da Seção de Diretoria Técnica de Informática.

Aos funcionários da STAEPE, Mauricio, Patrick, Carlos e Samuel, os meus agradecimentos por toda ajuda no desenvolvimento das atividades da Graduação e Pós-graduação. Aos Funcionários da Triagem, Esterilização, Distribuição de Materiais, Lavanderia e Limpeza, fundamentais no funcionamento das atividades clínicas.

Aos funcionários da Manutenção, que sempre estiveram a disposição nos atendendo prontamente. Os meus agradecimentos. Aos Vigias por zelarem pela nossa Universidade e cuidarem dela. A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o funcionamento e conforto da Instituição.

Aos alunos do curso de graduação em odontologia pela UNESP – Campus de Araçatuba, os meus agradecimentos pelo convívio.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito e agradecimento.

Enfim, a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta. Os meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADO!

Epígrafe



*“Todos nós fazemos escolhas na vida,
mas no final nossas escolhas nos fazem.”*

(Andrew Ryan – Bioshock)

Resumo



Fiorin, LG. *Influência do Tamoxifeno na remodelação óssea periimplantar*. 2019. 97 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar a remodelação óssea de implantes ósseointegrados instalados em tíbias de ratos modificados ou não sistemicamente pelo tamoxifeno. Foram utilizadas 72 ratas, os animais receberam ovariectomia bilateral, instalação dos implantes em tíbia bilateralmente e após 6 semanas, foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais (n=36), Grupo SS: administração de solução salina e Grupo TAM: administração de citrato de tamoxifeno, via gavagem por todo o período experimental. Doze animais de cada grupo foram eutanasiados aos 30, 60 e 90 dias após a administração da primeira dose das soluções, as tíbias direita e esquerda foram coletadas, e aleatoriamente processadas com desmineralização para as análises histológicas, imunoistoquímicas e para a análise de porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) e sem desmineralização para análise do contato osso/implante (BIC) e para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Espectroscopia Dispersiva de Raio-x (EDS). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$) em programa computacional especializado. Com relação ao contato osso/implante, o grupo TAM, apresentou maior BIC em todos os períodos experimentais quando comparado com o grupo SS. O grupo TAM apresentou também maior PTON em todos os períodos experimentais quando comparado com o grupo SS. A análise histológica dos tecidos periimplantares mostrou que o grupo TAM apresentou características

histológicas que se mostraram similares ao grupo controle, no entanto, com maior quantidade de tecido ósseo peri-implantar e menor quantidade de tecido conjuntivo . Nos padrões de marcação imunoistoquímica, quando comparado ao grupo SS, o grupo TAM apresentou maior imunomarcação para RUNX-2 e OCN, menor marcação para TRAP e não houve diferenças quanto a marcação de BMP-2/4. Em respeito a análise EDS o grupo tamoxifeno apresentou maior Fração de Ca/P em área regenerada em relação ao grupo SS todos os períodos experimentais. Comparado ao grupo ss, o grupo tamoxifeno mostrou na análise MEV uma superfície óssea periimplantar com maior presença de fibras de colágeno a partir do período de 30 dias, sendo mais evidente no período de 90 dias, enquanto no grupo SS a quantidade de fibras é mantida em um perfil mais baixo e decrescente. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o Tamoxifeno exerceu uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar em implantes osseointegrados.

Palavras chaves: Implantes; ósseointegração; tamoxifeno; modelos animais.

Abstract



Fiorin, LG. **Influence of tamoxifen on periimplant bone remodeling.** 2019. 97f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the bone remodeling of osseointegrated implants installed in tibias of rats modified or not systemically modified by tamoxifen. Seventy-two female rats were used, the animals received bilateral ovariectomy, tibial implant placement bilaterally and after 6 weeks were randomly assigned to two experimental groups (n = 36). Group SS: received saline administration and Group TAM: received administration of tamoxifen citrate via gavage throughout the experimental period. Twelve animals from each group were euthanized at 30, 60 and 90 days after administration of the first dose of the solutions. The right and left tibias were collected, processed with demineralization for histological, immunohistochemical and percentage analysis of neoformed bone tissue. (PTON) and without demineralization for bone / implant contact analysis (BIC) and for Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray Dispersive Spectroscopy (EDS). The data obtained were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$) in a specialized computer program. With regard to implant bone contact, the TAM group presented higher BIC in all experimental periods when compared to the SS group. The TAM group also presented higher PTON in all experimental periods when compared to the SS group. Histological analysis of periimplant tissues showed that the TAM group presented histological characteristics that were similar to the control group, however, with a larger amount of peri-implant bone tissue and a smaller amount

of connective tissue. In the immunohistochemical staining patterns, when compared to the SS group, the TAM group presented higher immunostaining for RUNX-2 and OCN, lower TRAP labeling and no differences regarding BMP-2/4 labeling. Regarding the EDS analysis, the tamoxifen group presented higher Ca / P fraction in regenerated area in relation to the SS group all experimental periods. Compared to the ss group, the tamoxifen group showed in the SEM analysis a periimplant bone surface with greater presence of collagen fibers from 30 days, being more evident over 90 days, while in the SS group the amount of fibers is maintained. in a lower and decreasing profile. Within the limits of the present study, it can be concluded that Tamoxifen had a positive influence on periimplant bone remodeling in osseointegrated implants.

Keywords: Implants; ósseointegration; tamoxifen; Animal models.

Lista de Figuras



Manuscrito para publicação

Figura 1	Contato osso/implante para cada grupo experimental.	77
Figura 2	Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental	78
Figura 3	Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	79
Figura 4	Padrão de imunomarcção de BMP2/4 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	80
Figura 5	Padrão de imunomarcção de RUNX2 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	81
Figura 6	Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	82
Figura 7	Análise elementar e ultraestrutural dos tecidos peri-implantares.	83

***Lista de Abreviaturas e
Símbolos***



Manuscrito para publicação

%.....	Porcentagem
C°.....	Grau Celsius
®.....	Marca registrada
±.....	Mais ou menos
≤.....	Menor ou igual
AM	Amazonas, Brasil
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AT	Área total
BIC	<i>Bone/implant contact</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP2/4	Proteína morfogenética óssea 2/4, <i>bone morphogenetic protein 2/4</i>
BIC.....	Bone/implant contact
Ca.....	Cálcio
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA.....	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA.....	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
d.....	Dias
DAB	3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ET	Extensão total
EDS.....	Espectroscopia de Dispersão de Raio X
ER α	Receptores de Estrógeno Alfa
ER β	Receptores de Estrógeno Beta

FOA-UNESP Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

g Grama

h..... Hora

HE..... Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e Eosina

IGF 1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

INCA Instituto Nacional de Câncer

Kg..... Quilogramas

MEV..... Microscopia eletrônica de varredura

Mg..... Miligramas

mg/Kg..... Miligramas por quilogramas

ml Mililitro

mm..... Milímetros

mm² Milímetro quadrado

OCN Osteocalcina

OMS..... Organização Mundial da Saúde

P..... Fosfato

Ph Potencial Hidrogeniônico

PTON Porcentagem de tecido ósseo neoformado

ROI Região de interesse, *region of interest*

RPM..... Rotações por minuto

RUNX2 Fator de transcrição relacionado a runt 2, *runt-related transcription factor 2*

SS..... Solução de cloreto de sódio 0,9%;

SERM..... Modulador Seletivo dos receptores de estrógeno

TAM..... Tamoxifeno

TRAP Fosfatase ácida resistente ao tartarato, *tartrate-resistant acid phosphatase*

μm Micrômetros;

Lista de Anexos



Manuscrito para publicação

Anexo

A	Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontology”.	84
B	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA)	94
C	Delineamento Experimental	95
D	Protocolo Para Ovariectomia	95
E	Protocolo Para Determinação do Ciclo Estral	96
F	Protocolo Para Administração das Soluções por Gavagem	97
G	Protocolo Para Instalação dos Implantes	97

Sumário



Sumário

Manuscrito para publicação	33
Página de título	34
Resumo	35
Introdução	38
Materiais e Métodos	42
Resultados	55
Discussão	61
Conclusão	66
Agradecimentos	67
Referências	68
Figuras	77
Anexos	84

Manuscrito

para Publicação

** Artigo elaborado Segundo a Normatização da Revista
Journal of Periodontology*

(Anexo A)

Título:

Influência do Tamoxifeno na remodelação óssea periimplantar

Autores:

Luiz Guilherme Fiorin¹, Juliano Milanezi de Almeida^{1*}.

¹São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Running title: Influência do Tamoxifeno no osso periimplantar.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Resumo



Resumo

Objetivo: O propósito do presente estudo foi avaliar a remodelação óssea de implantes ósseointegrados instalados em tíbias de ratos modificados ou não sistemicamente pelo tamoxifeno. **Metodologia:** 72 ratas receberam bilateralmente; ovariectomia, instalação dos implantes em tíbia e após 6 semanas, foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais (n=36), Grupo SS: administração de solução salina e Grupo TAM: administração de citrato de tamoxifeno, via gavagem por todo o período experimental. Doze animais de cada grupo foram eutanasiados aos 30, 60 e 90 dias após a administração da primeira dose das soluções, as tíbias foram coletadas e aleatoriamente processadas com e sem desmineralização. **Resultados:** O grupo TAM apresentou maior BIC e PTON em todos os períodos experimentais. A análise histológica dos tecidos periimplantares mostrou que o grupo TAM apresentou características histológicas que se mostraram similares ao grupo controle com maior quantidade de tecido ósseo peri-implantar e menor quantidade de tecido conjuntivo. Para a imunistoquímica, quando comparado ao grupo SS, o grupo TAM apresentou maior imunomarcagem para RUNX-2 e OCN, menor marcação para TRAP. Para análise EDS o grupo tamoxifeno apresentou maior Fração de Ca/P em relação ao grupo SS todos os períodos experimentais. Comparado ao grupo SS, o grupo tamoxifeno mostrou na análise MEV uma superfície óssea periimplantar com maior presença de fibras de colágeno, sendo mais evidente no período de 90 dias, enquanto no grupo SS a quantidade de fibras é mantida em um perfil mais baixo e decrescente. **Conclusão:** Pode-se concluir que o Tamoxifeno exerceu uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar.

Palavras chaves: Implantes; ósseointegração; tamoxifeno; modelos animais.

Introdução



Introdução

A ósseointegração, essencial para o sucesso clínico dos implantes dentais em longo prazo, envolve a direta ancoragem do implante pela formação óssea sem o crescimento de um tecido fibroso na interface osso/implante, e representa um processo dinâmico tanto em seu estabelecimento quanto em sua manutenção¹⁻³. Embora a taxa de sucesso relatada para os implantes de titânio seja elevada, falhas ocorrem, e diferentes fatores locais e sistêmicos podem contribuir⁴⁻⁶.

A implantodontia tem alcançado status ouro entre a população, difundida como principal tratamento restaurador estético e funcional, sendo o principal foco populacional do tratamento adultos acima dos 60 anos. Concomitantemente no Brasil, podemos perceber um fenômeno de envelhecimento da população acompanhado de um envelhecimento da população feminina. Projeções da Secretaria dos direitos humanos estimam que em 2020, 14% da população será composta de mulheres idosas, apesar das condições adversas que acompanham o aumento da faixa etária do grupo, a procura pela reabilitação oral com próteses implanto-suportadas tem sido crescente.

Com o envelhecimento da população, há também o surgimento de patologias sistêmicas que comprometem a saúde geral do indivíduo. Neste contexto, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) determinou 57 mil novos casos de câncer de mama registrado em 2018 correspondendo sozinho a 29,5% dos novos casos de câncer entre as mulheres no Brasil. Sua etiologia pode ser multifatorial, no entanto fatores de risco podem ser relacionados como; fatores genéticos, ambientais, endócrinos e relativos a história reprodutiva, sendo os 2 últimos fatores que se tornam mais presentes em mulheres com idade mais avançada, principalmente após os 50 anos. Oitenta por cento dos tumores de mama são diagnosticados em mulheres pós menopausa, e a vasta maioria apresenta receptores hormonais que quando ativados elevam a taxa de proliferação das células tumorais^{8,9}.

Algumas terapias tem sido utilizadas para mimetizar os efeitos de supressão da reabsorção e estimulação da formação óssea do estrógeno¹⁰ e apesar de não ser uma terapia utilizada com foco para o tratamento de condições causadas pela ausência do estrogênio, o Tamoxifeno possui ação agonista no osso⁹. O tamoxifeno é um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) comumente utilizado em associação com outros fármacos no tratamento de câncer de mama, é considerado o tratamento “gold standard” como terapia endócrina para o tratamento de câncer de mama⁹, sendo administrado por um período de 5 a 10 anos¹¹ tem com a função de bloquear receptores de estrógeno nas células câncerígenas e age como agonista do estrógeno no tecido ósseo, sendo o tecido ósseo mais sensível ao hormônio. Em particular o Tamoxifeno tem parcial efeito agonista em receptor de estrógeno e reduz o turnover ósseo prevenindo assim a perda óssea em mulheres após a menopausa¹². Por outro lado, alguns estudos relatam que a terapia endócrina afeta negativamente o metabolismo ósseo como resultado de prejuízo na função ovariana e/ou privação de estrógeno, aumentando assim o risco de fraturas^{13,14}. Entretanto, o mecanismo pelo qual o Tamoxifeno regula o metabolismo ósseo não está totalmente claro e apesar do foco de utilização ser o tratamento do câncer, relatos na literatura reportam que o Tamoxifeno mimetiza os efeitos do estrógeno no tecido ósseo, prevenindo a perda óssea em mulheres após a menopausa, por inibir diretamente a formação de osteoclastos e reabsorção óssea enquanto aumenta a apoptose de osteoclastos¹². Na literatura, dentro de nosso conhecimento, o único estudo que relata os efeitos do modulador seletivo do receptor de estrógeno, é o estudo¹⁵ no qual relatam que o Raloxifeno pode compensar o prejuízo na ósseointegração em ratos osteoporóticos. O Raloxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno de segunda geração com ação agonista no osso e sistema cardiovascular e ação antagonista na mama e útero.

O sucesso dos implantes ósseos integrados está altamente associado a ósseointegração¹⁶ que pode ser afetada por fatores como, tratamento de superfície do implante, formato do implante e densidade e quantidade do tecido ósseo no leito receptor. A neoformação óssea requer o recrutamento de células multipotentes do sistema mesenquimal, as quais são capazes de se proliferar e se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo os osteoblastos¹⁷.

Apesar da alta taxa de sucesso dos implantes ósseo integrados, chegando a valores superiores a 95%¹⁸⁻²⁰, a deficiência de estrógeno pode causar alterações no processo de reparo, com diminuição da qualidade do tecido ósseo, cavidades de reabsorção profundas, perfuração da cortical óssea e perda de osso trabeculado⁹. Estudos clássicos²¹⁻²³ indicam que a deficiência de estrógeno tem um influência negativa sobre os implantes previamente ósseo integrados, favorecendo assim o insucesso da cirurgia e a perda do implante instalado, pois o estrógeno além de promover um atraso na apoptose dos osteoblastos, induz a produção de IGF-1 e procolágeno, resultando em melhor reparo do tecido ósseo^{10,24}.

A literatura²³ tem demonstrado resultados controversos com relação a ausência do estrógeno em estudos experimentais, demonstrando que a deficiência estrogênica não pode ser considerada como um fator de risco para falhas em implantes ósseo integrados em mandíbulas de ratas submetidas à ovariectomia. Por outro lado, estudos utilizando animais ovariectomizados como modelos de indução de osteoporose com implantes tem demonstrado que a deficiência do estrógeno resulta em uma menor taxa de renovação, menor taxa de contato direto entre o tecido ósseo e implante, competência biomecânica na interface do osso com o implante e redução na densidade em osso medular^{22,23,25-32}.

Em ratos, o padrão anatômico e cinético da perda de massa óssea mimetiza o padrão em humanos³³, vários investigadores tem usado ratos ovariectomizados para o estudo da perda óssea induzida por deficiência de estrógeno como um fator de risco em potencial na instalação e manutenção de implantes dentais, pois a qualidade do tecido ósseo tem relação com seu sucesso^{21,24,26-33}.

O Objetivo do Trabalho foi avaliar a influência do Tamoxifeno no tecido ósseo periimplantar em implantes de Titânio osseointegrados. Sendo que nossa hipótese nula é que o Tamoxifeno não influencia na remodelação óssea de implantes osseointegrados.

Material e Métodos



Material e Métodos

Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 00520-2017) (Anexo B). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments³⁴.

Cálculo Amostral

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 1 – Estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório³⁵. 2 – Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. Foi determinado o poder do teste de 80% com valor de α de 5%. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0³⁶, que determinou um número mínimo de 8 repetições por tratamento em cada período. Considerando as perdas em animais modificados sistemicamente, o número de animais em cada período experimental foi estabelecido em 12 animais.

Animais

Foram utilizados no presente estudo 72 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), pesando aproximadamente 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por todo o período experimental.

³⁶ BioEstat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil

Grupos Experimentais e Tratamentos

Utilizando de um programa computacional, os 72 animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais, grupo SS e o grupo TAM cada um composto por 36 animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo SS: Também chamado de grupo controle. Os animais pertencentes a este grupo receberam ovariectomia bilateral 24 semanas antes da determinação do ciclo estral, após 2 semanas receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas receberam administração por gavagem de 0,5 ml de solução salina a 0.9% por todo o período experimental.

Grupo TAM: Os animais pertencentes a este grupo receberam a ovariectomia bilateral 24 semanas antes da determinação do ciclo estral, após 2 semanas receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas receberam administração por gavagem de 15mg/kg de tamoxifeno³⁶ por todo o período experimental.

Períodos experimentais

Doze animais de cada grupo foram eutanasiados na 10^a semana, 14^a semana, 18^a semana após o início do experimento representando os períodos de 30, 60 e 90 dias após o início da administração das soluções, por meio de superdosagem anestésica¹ aplicados via intraperitoneal. As tíbias direita e esquerda foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 4%. O delineamento experimental está demonstrado no anexo C.

¹ 150mg/kg de thiopental - Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil

Protocolo experimental

Protocolo para anestesia geral

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70mg/kg de Cloridrato de quetamina[⊕] e 6mg/kg Cloridrato de xilazina[⊗], aplicados intramuscular no bíceps femoris da pata direita. Nos casos em que não foi obtido o efeito adequado do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Protocolo para procedimento cirúrgico para ovariectomia

As ratas dos Grupos SS e TAM foram submetidas a ovariectomia bilateral. Foi realizada a tricotomia bilateral da região ventral e assepsia vigorosa com solução de Iodopovidona 10%[▲] em toda área.

Após preparo da área cirúrgica, com auxílio de lâmina de bisturi nº15, incisões bilaterais de aproximadamente 1cm de extensão, foram realizadas para se obter acesso aos ovários e, através das quais, realizados os procedimentos cirúrgicos que envolvem a remoção dos ovários. As suturas internas foram realizadas com fio absorvível Vicryl 4-0^ℵ e as suturas externas com fio de Seda 4-0[℞]. Cada animal recebeu dose única de antibiótico[∇] (administração intramuscular de 0,2 ml/animal) no pós-operatório imediato. anexo D.

[⊕] Vetaset – ZoetisFlorham Park, NJ – USA

[⊗] Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil.

[▲] Rioquímica, São Paulo, Brasil.

^ℵ Vicryl 4-0, Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA.

[℞] Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA

[∇] Pentabiótico Veterinário, Fontoura Wyeth S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

Protocolo para verificação do ciclo estral

A verificação do ciclo estral foi realizada 24 semanas após a ovariectomia durante 2 semanas. Para realização da coleta do lavado vaginal, foi utilizada uma pipeta confeccionada a partir de uma ponteira de polietileno de uma micropipeta³ e látex de garrote, que continha aproximadamente uma gota (0,3 ml) de solução salina 0,9% . As bordas da ponteira foram arredondadas para não machucarem as paredes vaginais dos animais. A ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina e uma gota de solução salina foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina para visualização ao microscópio, com magnificação de 10 e 40 vezes, sem a necessidade do uso de lamínula. A coleta foi realizada diariamente, no mesmo horário e o ciclo acompanhado por um mínimo de duas semanas^{37,38}. Os animais deviam se encontrar ao final da segunda semana em situação de Diestro, indicando os baixos níveis de Estradiol e a não proliferação e exfoliação das células da parede uterina, como visualizadas no período de estro, indicando a interrupção do ciclo³⁹. Caso o contrário seriam descartados do experimento. Anexo E.

Protocolo para administração do tamoxifeno e solução salina

A administração de 0,5 ml Solução Salina a 0,9%⁴ e do Tamoxifeno⁵ ocorreu via gavagem uma vez ao dia durante todo o período experimental.

A administração da solução salina e do Tamoxifeno tiveram o início a partir da 6ª Semana do início do experimento, permanecendo diariamente até o final do período experimental. Essa

³ Ponta de pipeta 1000 ml, Laborglass, Belenzinho, SP, Brasil

⁴ Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil

⁵ Citrato de Tamoxifeno, 15 mg/kg ml – Farmácia de Manipulação Aphoticário, Araçatuba, SP, Brasil

dose foi calculada seguindo a proporcionalidade do cálculo da dose em humanos, a qual se baseia na superfície corpórea para de terminação do volume da solução^{36,40}. Anexo F.

Protocolo de instalação dos implantes e grupos experimentais

Após Anestesia geral, a porção medial das patas direita e esquerda de cada animal foi tricotomizada e realizou-se a antisepsia com auxílio de solução tópica de iodopovidona a 10%. Os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção do animal em posição adequada para acesso às tíbias. Uma incisão de aproximadamente 30 mm foi realizada com lâmina de bisturi 15 C pelo lado medial nas tíbias. Após a dissecação com auxílio de um descolador de periósteo, o tecido ósseo foi exposto e perfurado um leito bicortical na metáfise tibial proximal usando uma fresa de 2,0 mm de diâmetro⁹ montada em motor cirúrgico com 980 rpm⁶, acompanhado por irrigação constante com solução salina fisiológica e aspiração com sugador de alta potência. Nos leitos preparados foram instalados um implante com superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido. Os implantes possuem 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro. A instalação foi realizada com auxílio de uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante até que o mesmo atinja o nível ósseo. Em seguida, o tecido muscular foi suturado internamente com fio 4.0 de poliglactina 910⁷. Anexo G.

Processamento Laboratorial

Processamento histológico sem desmineralização

Para a análise BIC, após fixação por 48 horas em solução de paraformaldeído tamponado 4%, as tíbias randomicamente selecionadas foram submetidas à lavagem em água corrente e à desidratação gradual em diferentes concentrações de etanol com adição de fucsina (5x10⁻³), seguida por trocas de acetona. Foram, então, submetidas a banhos de resina cristal de alta

⁹ DSP Biomedical, Campo Largo, Paraná, Brasil

⁶ KaVo Konzept Surg, Filial KaVo São Paulo, São Paulo, Brasil

⁷ Vicryl – Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Para saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil

viscosidade^d e incluídas a vácuo, utilizando-se a mesma resina, com a adição do catalisador. Após a presa do material, foram recortados os excessos de resina e as peças foram lixadas com lixas metalográficas de crescente granulação^e (#100 - #400 - #600 - #1200) até que atingissem a espessura de 30 µm. Ao alcançar a espessura aproximada de 1 mm, as peças foram coladas com adesivo à base de epóxi^f em placas de vidro identificadas para aumentar sua resistência e continuar a serem lixadas até que a espessura desejada seja atingida (Matheus 2016).

Processamento histológico com desmineralização

Após fixação por 48 horas em solução de paraformaldeído tamponado 4%, as tíbias randomicamente selecionadas foram submetidas à lavagem em água e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etileno diamino tetra-acético – EDTA, durante 60 dias). Após a desmineralização, o implante foi removido com o auxílio de uma chave digital (1,2 mm), as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, impregnadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja do implante e os cortes seriados que corresponderem à porção central da tal loja foram devidamente coletados. Seis secções equidistantes compreendendo a porção central do alvéolo do implante foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) para análise histométrica de porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) e histológica. Três outras secções, também equidistantes e compreendendo a porção central do alveolo, foram submetidas ao processamento imunistoquímico para detecção de proteína morfogenética ossea 2/4 (BMP 2/4), fator de transcrição relacionado ao Runt - 2 (RUNX2), osteocalcina (OCN) e Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

^d Arazyn 1.0#00, Redelease, Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil

^e CarbiMet 2, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA

^f Araldite Hobby, Brascola, Joinville, SC, Brasil

Processamento imunoistoquímico

Foi adotada a técnica da imunoperoxidase indireta para detecção dos antígenos propostos. As secções dos espécimes de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, sendo que cada lote foi incubado em cada um dos seguintes anticorpos primários: anti-BMP 2/4 do rato produzido em coelho[¶] (1:100); anti-RUNX2 do rato produzido em coelho[¶] (1:100); anti-OCN do rato produzido em cabra[¶] (1:100); anti-TRAP do rato produzido em cabra[¶] (1:100). Em seguida, os lotes destinados a detecção de BMP 2/4 e RUNX2 foram inicialmente incubados por 90 minutos em solução contendo anticorpo secundário biotilado de coelho produzido em cabra[¶] (1:200), e em seguida tratados pela estreptavidina conjugada a peroxidase[¶] (1:200), também por 90 minutos. Os lotes destinados para detecção de OCN e TRAP foram inicialmente incubados em solução contendo anticorpo secundário biotilado de cabra produzido em coelho[¶] (1:200) e em seguida tratadas pela estreptavidina conjugada a peroxidase[¶] (1:200), também por 90 minutos. A reação foi revelada através do cromogeno 3,3' tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB)[¶]. Ao término das revelações, os lotes de BMP2/4, OCN e TRAP foram contra corados por Hematoxilina de Harris, e RUNX2, por Fast Green. Como controle negativo, outras secções foram submetidas ao mesmo processamento, contudo, suprimindo-se a incubação nos respectivos anticorpos primários.

[¶] SC-9003; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

[¶] SC-10758; Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

[¶] SC- 18319; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

[¶] SC-30833; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

[¶] K0675; BiotInylated Link, Dako North Americ Inc.

[¶] K0675; *Streptavidin – HRP*; North America Inc.

[¶] ZB0923; *Biotinylated anti-goat IgG [H+L]*, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA

[¶] ZC0422; *R.T.U Streptavidin/Peroxidase Complex*, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA

[¶] DAB chromogen KitR; Dako Laboratories

Processamento para análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva de raio-x (EDS)

Depois da eutanásia e coleta, as tíbias foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em cacodilato tamponado 0.1M (pH 7,4) a temperatura ambiente por 4 horas, e transferidos para uma solução pura de cacodilato 0.1M⁴¹. Em seguida foram desidratadas em soluções de concentração alcoólica crescente e incluídas em resina de alta viscosidade. Os blocos de resina foram recortados e lixados em direção longitudinal ao implante até atingirem a espessura de 30µm, seguindo o protocolo descrito para o processamento sem desmineralização. As secções foram polidas com suspensões de diamante com tamanhos de partículas de 6, 1 e 0,25µm. Cada secção polida terá sua superfície submetida a ataque ácido (ácido fosfórico 37%) por 1 minuto, e então lavadas em solução hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos. Após secagem foram revestidos com ouro e paládio para análise em microscopia eletrônica de varredura⁴².

Análise dos resultados

As análises histométricas de BIC e PTON, bem como a análise imunoistoquímica para cada um dos biomarcadores, foram realizadas por um examinador (LGF) calibrado e cego aos grupos e períodos experimentais. Um histologista certificado (EE) foi responsável por validar as análises anteriores, bem como realizar a análise histológica. A análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura foi realizada por outro examinador, treinado, calibrado e cego aos grupos experimentais (CPBD).

Regiões de interesse

A delimitação das regiões de interesse para cada análise foi estabelecida pelo histologista certificado (EE), baseando-se na disposição e relevância dos eventos biológicos ocorrendo nos tecidos que circundam o implante.

ROI 1: determinada como sendo a região que compreende toda a extensão dos tecidos que circundam os implantes. Seleccionada como região de interesse para realização da análise histológica.

ROI 2: determinada como a região que compreende o tecido ao redor de uma rosca do implante localizada em tecido ósseo compacto e duas localizadas em tecido ósseo medular. Para seleção da ROI 2 de uma maneira padronizada, a partir do ápice do implante foram seleccionadas a segunda rosca localizada em tecido ósseo cortical e a primeira e segunda rosca localizada em tecido ósseo medular, para realização das análises de BIC, PTON, imunoistoquímica e de microscopia de Varredura.

ROI 3: determinada como a região que compreende o tecido ao redor de duas roscas localizadas exclusivamente em tecido ósseo medular e uma área de 1mm² em osso basal. Para seleção da ROI 3 de uma maneira padronizada, a partir do ápice do implante foram seleccionadas a primeira e segunda roscas localizadas em tecido ósseo medular, para seleção da área de osso basal foi seleccionada a região óssea medular mais distante do implante, para realização da análise de espectroscopia de energia dispersiva.

Análise histométrica de contato direto osso/implante (BIC)

A análise do contato direto osso/implante foi realizada utilizando-se um sistema de análise de imagem por meio de camera digital⁸ acoplada a microscópio óptico¹. As imagens das lâminas foram capturadas em ROI 2 e utilizando o software ImageJ, foram realizadas medidas lineares da extensão total (ET) da superfície de titânio, em seguida foram realizadas medidas lineares das regiões com contato entre o tecido ósseo e o titâneo. A extensão total foi mensurada em mm e considerada como 100% do contato. O BIC foi também mensurado em mm e expresso como uma porcentagem da ET

Análise da área de tecido ósseo neoformado (PTON)

A análise da área de tecido ósseo neoformado na região peri-implantar foi realizada utilizando-se um sistema de análise de imagem por meio de camera digital⁸ acoplada a microscópio óptico¹. As imagens das lâminas foram capturadas e utilizando o software ImageJ, foram realizadas medidas da área total (AT) que compreende ROI2 , em seguida, no interior da AT, foi mensurada a área de tecido ósseo neoformado (ATON). A área total foi mensurada em mm² e considerada como 100% da área. A ATON foi também mensurado em mm² e expressa como uma porcentagem da AT.

⁸ AxioCamR; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha

¹ AxioLabR; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha

Análise histológica dos tecidos peri-implantares

Foi realizada em ROI 1, nas secções coradas por HE, sob microscopia óptica^l. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo peri-implantar (quando presente); 2) padrão de celularidade e estruturação do tecido conjuntivo peri-implantar (quando presente); 3) padrão inflamatório peri-implantar, ou seja, natureza e intensidade do processo inflamatório local (quando presente).

Análise imunohistoquímica

Foi realizada sob microscopia óptica^l em um aumento original de 400x. Para BMP2/4 e OCN foi realizada a contagem de células imunoreativas para cada biomarcador, que se encontravam em contato com o tecido ósseo. Para RUNX2, foi realizada contagem do número de células imunorreativas em ROI 2.

Para TRAP, sob microscopia óptica e aumento original de 400x, foi realizada a contagem de células TRAP-positivas que se encontravam em contato com o tecido ósseo.

Análise ultraestrutural e elementar

Para a análise EDS, em ROI 3 realizou-se a determinação da Fração de Ca/P do osso regenerado dividida pela fração de Ca/P do osso basal do mesmo espécime para normalização dos dados. A análise morfológica, feita em ROI 2 consta da descrição das características

^l AxioLabR; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha

^l AxioLabR; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha

anatômicas do tecido ósseo na região de interface osso/implante . As análises foram realizadas por um microscópio de Varredura com Sonda para EDS^d.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa BioEstat 5.0^e. A normalidade de distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados das análises de BIC, PTON, RUNX2, TRAP, OCN, BMP2/4 foram submetidas ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois critério e o pós teste de Bonferroni. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0.05$.

^d JEOL JSM 6610 SEM, Jeol Nikon, Japan

^e Mimirua Institute, Manaus, AM, Brasil

Resultados



Resultados

Independentemente de grupo experimental, todos animais utilizados pela presente pesquisa se apresentaram saudáveis e não mostraram nenhuma complicação durante todo o período de execução do protocolo do experimento. Após coleta dos dados, o teste para verificação do poder do estudo indicou 94,37%.

Análise do contato osso/implante (BIC)

Os resultados para a análise de contato osso/implante (BIC) estão representados na figura 1. Na análise intergrupos, o grupo SS ($89,55 \pm 7,32$; $89,81 \pm 6,74$; $85,59 \pm 3,08$) apresentou menor BIC aos 30, 60 e 90 dias respectivamente quando comparado ao grupo TAM nos mesmos períodos ($94,45 \pm 5,7$; $95,63 \pm 4,43$; $96,24 \pm 3,5$) ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa de BIC nos períodos de 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$).

Análise de área de tecido ósseo neoformado (PTON)

Os resultados para a análise de área de tecido ósseo neoformado (ATON) estão representados na figura 2a. Na análise intergrupos, o grupo SS ($36,54 \pm 6,09$; $55,89 \pm 10,79$; $55,23 \pm 7,52$) apresentou menor PTON nos períodos de 30, 60 e 90 dias quando comparado ao grupo TAM ($64,89 \pm 13,7$; $69,11 \pm 7,59$; $81,21 \pm 10,23$) ($p \leq 0,05$) nos mesmos períodos. Na análise intragrupo, ao comparar os diferentes períodos, o grupo SS apresentou menor PTON quando comparados os períodos de 30 ($36,54 \pm 6,09$) e 60 ($55,89 \pm 10,79$) dias e 30 ($36,54 \pm 6,09$) e 90 ($55,23 \pm 7,52$) ($p \leq 0,05$) dias. No grupo TAM, houve diferença quando comparados os períodos experimentais de 30 ($64,89 \pm 13,7$) e 90 ($81,21 \pm 10,23$) dias e 60 ($69,11 \pm 7,59$) e 90 ($81,21 \pm 10,23$) dias ($p \leq 0,05$).

Análise histológica dos tecidos peri-implantares

Os resultados para a análise histológica estão representados na figura 2b. No grupo SS constatou-se aos 30, 60 e 90 dias um predomínio de tecido ósseo vital na região peri-implantar, tanto nas roscas situadas em tecido ósseo compacto quanto nas roscas constituídas por tecido ósseo medular. Nestes diferentes tipos de tecido ósseo observou-se pequena quantidade de osteoclastos ativos, grande quantidade de lacunas preenchidas por osteócitos e a superfície da matriz óssea revestida por osteoblastos ou células de revestimento ósseo. Em algumas regiões, especialmente aos 30 dias, observou-se associado a este tecido ósseo uma pequena quantidade de tecido conjuntivo, composto por quantidades equivalentes de fibroblastos e fibras colágenas, sendo raros os focos de células inflamatórias. Aos 60 dias, constatou-se poucas regiões ocupadas por tecido conjuntivo e os espaços medulares do tecido ósseo se mostravam ocupados por tecido hematopoético.

No grupo TAM, tanto aos 30 quanto aos 60 dias, as características histológicas se mostraram similares ao grupo controle, no entanto, com maior quantidade de tecido ósseo peri-implantar e menor quantidade de tecido conjuntivo. No tecido ósseo peri-implantar observou-se raros osteoclastos, grande quantidade de lacunas ocupadas por osteócitos, no entanto, algumas lacunas se mostravam vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos, a matriz óssea se apresentou revestida predominantemente por células de revestimento ósseo. Aos 60 dias constatou-se em alguns espécies áreas de tecido ósseo não vital e um aumento de lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos. A maior área de tecido ósseo reduziu significativamente tanto as áreas de tecido conjuntivo quanto as áreas de tecido hematopoético, os quais se mostravam com características histológicas similares ao grupo controle.

Análise imunohistoquímica

A reação imunohistoquímica utilizada para detecção de BMP2/4, RUNX2, OCN e TRAP mostrou alta especificidade por esses biomarcadores, confirmada pela completa ausência de marcação no controle negativo. A imunomarcação apresentou coloração acastanhada, confinada ao núcleo para RUNX2, confinada ao citoplasma para TRAP e confinada ao citoplasma e fracamente a matriz extracelular para BMP2/4 e OCN.

TRAP

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a TRAP estão apresentados na Figura 3A. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo TAM ($2,83 \pm 0,98$; $2,66 \pm 0,81$; $2,66 \pm 1,03$), o grupo SS ($4,66 \pm 1,5$; $6,5 \pm 1,37$; $8,5 \pm 4,63$) apresentou maior número de células TRAP-positivas nos períodos de 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo SS apresentou diferença estatística no número de células TRAP-positivas em todos os períodos ($p \leq 0,05$).

BMP2/4

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a BMP2/4 estão apresentados na Figura 4A. Quando comparado ao grupo TAM ($28 \pm 8,48$; $34,66 \pm 9$; $20,66 \pm 9,11$), o grupo SS ($35,16 \pm 6,46$; $27 \pm 14,88$; $24,66 \pm 5,24$) não apresentou diferença estatisticamente significativa de BMP2/4-positivas nos períodos de 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatística na análise intragrupo.

RUNX2

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a RUNX2 estão apresentados na Figura 5a. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo TAM ($10,5 \pm 3,27$; $9 \pm 1,54$; $8,83 \pm 1,47$), o grupo SS ($5,33 \pm 1,63$; $6 \pm 1,09$; $4,83 \pm 1,72$) apresentou menor número de células RUNX2-positivas nos períodos de 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo TAM apresentou diferença estatística no número de células RUNX2-positivas entre os períodos de 30 e 60 dias e 30 e 90 dias ($p \leq 0,05$).

OCN

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a OCN estão apresentados na Figura 6a. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo TAM ($21,83 \pm 8,86$; $19,66 \pm 5,85$; $19,83 \pm 0,4$) o grupo SS ($11,5 \pm 3,01$; $13 \pm 3,46$; $15,5 \pm 3,5$) apresentou menor número de células OCN-positivas nos períodos de 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo SS apresentou menor número de células OCN-positivas entre os aos 30 dias quando comparado aos 90 dias ($p \leq 0,05$).

Análise por Espectroscopia Multipla de Raio X

Os resultados para a análise por Espectroscopia Multipla de Raio X (EDS) estão representados na figura 7a. Na análise intergrupos, o grupo TAM apresentou maior quantidade de porção inorgânica mineralizada em área regenerada em relação ao osso basal ($1,07 \pm 0,08$; $1,15 \pm 0,39$; $1,21 \pm 0,2$) quando comparado ao grupo SS ($0,92 \pm 0,09$; $0,88 \pm 0,06$; $0,82 \pm 0,15$) em

todos os períodos experimentais($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa na análise intragrupos ($p \leq 0,05$).

Análise Microscopia eletrônica de Varredura

Os resultados para a análise de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) estão representados na figura 7b. Comparado ao grupo SS, o grupo tamoxifeno mostrou uma superfície óssea periimplantar com maior presença de fibras de colágeno a partir do período de 30 dias, sendo mais evidente no período de 90 dias, período no qual o grupo exibe finas fibras de colágeno se agrupando em feixes mais calibrosos. No grupo SS a quantidade de fibras é mantida em um perfil mais baixo e decrescente.

Discussão



Discussão

Tendo como Objetivo avaliar a influência do Tamoxifeno na remodelação óssea periimplantar nós refutamos a hipótese nula, tendo em vista que a utilização de implantes de titânio ósseo integráveis tornou a previsibilidade do tratamento e seu sucesso características previsíveis no tratamento, mesmo que em contrapartida, alguns fatores sistêmicos podem comprometer a ósseo integração e a remodelação do osso já ósseo integrado.

A ação do Tamoxifeno pode ser explicada por uma ação seletiva dos subtipos dos receptores de estrógeno. Os receptores de estrógeno são compostos por 2 subtipos, alfa (ER α) e beta (ER β), o primeiro subtipo é o principal alvo do tamoxifeno e encontra-se em maior expressão nas glândulas mamárias e no tecido ósseo⁴³. A ativação do ER α possui efeito proliferativo⁸ que é bloqueado pelo tamoxifeno ao se ligar ao receptor, essa ligação altera a posição de hélices do DNA e inativa o receptor⁴⁴, apesar da inativação do receptor, a via de ação agonista do Tamoxifeno no tecido ósseo necessita de elucidação. A partir da fundamentação de que os casos de câncer são crescentes e a terapia endócrina coadjuvante é amplamente utilizada. O entendimento da influência do Tamoxifeno na remodelação óssea foi o objetivo do presente estudo.

Modelos animais tem sido utilizados como modelo para estudo de doenças relacionadas a deficiência de estrógeno há aproximadamente 3 décadas e se mostram fontes confiáveis para análise das alterações ósseas derivadas de alterações hormonais, demonstrando padrão semelhante de perda óssea à de mulheres pós menopausa⁴⁵⁻⁴⁹. Apesar do contato osso/implante ser considerado pela literatura o padrão de avaliação de sucesso da instalação de implantes, outras características devem ser levadas em consideração. Condições sistêmicas que afetam o metabolismo ósseo nem sempre se refletem na diminuição do BIC, mas podem afetar a área de tecido ósseo neoformado entre as roscas do implante, sendo esse um fator que se mostra importante quando avaliamos o implante em função. A maior quantidade de tecido ósseo está

diretamente relacionada com a capacidade de dissipação de forças e, indiretamente, relacionada com a criação de pontos de estresse entre o implante e o osso.

No tecido ósseo o tamoxifeno apresenta-se com propriedades parcialmente agonistas similares a do estrógeno, diminuindo a atividade de osteoclasto e aumentando a atividade de células osteoprogenitoras^{22,23,30,50-53}. Quando observadas as características histológicas podemos analisar um padrão similar entre ambos os grupos e apesar de não detectarmos diferenças entre o número de células BMP2/4-positivas, de acordo com nossos achados sob a influência da deficiência do estrógeno e da influência do Tamoxifeno, o grupo SS apresentou menor Contato Osso/Implante e menor área de formação óssea quando comparado ao grupo TAM, também foi possível observar no atual estudo menor número de células TRAP- positivas no grupo TAM, indicando a diminuição da atividade osteoclástica e sugerindo a reversão de características comuns em pacientes com diminuição do estrógeno, como o aumento da reabsorção e diminuição do volume ósseo²², reequilibrando a formação óssea com a reabsorção, característica que afeta diretamente a ósseointegração dos implantes de titânio.

A formação de osso não vital é uma situação comum observada em fármacos que alteram o metabolismo ósseo^{54,55}, Bisfosfonatos são exemplos de drogas que mantêm a estruturação óssea, mas que não possuem a presença de osteócitos, formando uma região de osso não vital, responsáveis por necrose óssea decorrente de medicamentos. Em nosso estudo podemos verificar no grupo TAM a formação de lacunas que se mostravam vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos, indicando a também formação de osso não vital com o uso do Tamoxifeno em uma pequena extensão. Apesar da formação dessas áreas, a extensão não foi suficiente para causar áreas de necrose como estabelecida em modelos animais⁵⁶.

Em uma análise ultraestrutural podemos observar um perfil crescente de fibras colágenas no grupo TAM quando comparado ao grupo SS. A partir dos 30 dias as finas fibras colágenas aumentam em quantidade e se organizam em feixes mais calibrosos, enquanto o grupo SS,

mantém um perfil decrescente e desorganizado. O colágeno é a proteína que se apresenta em maior abundância nos seres vertebrados, e está diretamente relacionado com a mineralização do tecido⁵⁷. Apesar das propriedades antagonistas a fibroblastos e fibras colágenas em quelóides⁵⁸ estudos anteriores demonstram a relação entre o estrógeno e a quantidade de fibras colágenas presentes no tecido ósseo⁵⁹. O Tamoxifeno é responsável pelo aumento de osteonectina, proteína que possui influência na formação de fibras colágenas, desenvolvimento da matrix e diferenciação do osteoblasto⁶⁰.

O efeito mineralizante do tamoxifeno é relatado desde a década de 90, embora seu mecanismo ainda não seja totalmente elucidado, estudos *in vitro*, demonstram que sob o tratamento do tamoxifeno, as células apresentaram aumento tempo dependente na quantidade de cálcio acumulada na matrix extracelular⁶¹. Como uma alternativa a determinação isolada da porcentagem de Ca e P em relação ao peso total do osso, a espectroscopia de raio-x por dispersão de energia se apresenta como uma forma confiável para a determinação da taxa entre cálcio e fosfato presente na área determinada do tecido ósseo, podendo oferecer informações mais precisas para o diagnóstico de patologias ósseas⁶². O que justifica nossos resultados.

Estudo anterior aponta que em condições de normalidade há o aumento da taxa Ca/P em ossos que estão em processo de regeneração, sugerindo o aumento dos componentes inorgânicos minerais no tecido ósseo e a diminuição dos componentes orgânicos até a maturação do tecido⁶³, a mineralização do tecido tem relação direta com a microestrutura lamelar do osso, que com o passar do tempo aumenta sua dureza e seu módulo elástico, aumentando o torque de remoção de implantes de maior período^{64,65}. No atual estudo, podemos observar que após o período de ósseointegração, houve um aumento na taxa entre Ca/P no grupo TAM em todos os períodos quando comparado ao grupo SS, esse resultado é condizente com a diferença entre células OCN-positivas quando comparamos o grupo SS com o grupo TAM, aonde podemos verificar um maior número de células no grupo TAM, podemos assim levantar a hipótese de que o aumento da OCN

associado ao aumento de Osteonectina promovem a formação óssea através da calcificação da matrix, estimulados pela ação do Tamoxifeno.

Extrapolando esses resultados para humanos, de acordo com nosso estudo pré-clínico, podemos concluir que o tratamento com o tamoxifeno apresenta uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar, revertendo total ou parcialmente os efeitos da diminuição do estrógeno, assim podendo apresentar melhora na taxa de sucesso e a longividade de implantes de titânio, entretanto, outros estudos em humanos são necessários para confirmar esses resultados.

Conclusão



Conclusão

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o tamoxifeno exerceu uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar em implantes de titânio osseointegrados.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade de São Paulo-UNESP, Araçatuba, São Paulo

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de MESTRADO (CAPES-DS; 01/10/2017 - 28/02/2018), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), também pela concessão de bolsa de mestrado (processo 2017/11688-4; 01/04/2018 a 01/02/2020).

Ao “Laboratorio Di Sezioni Sottili” do Departamento de Ciência Biomédica, cirúrgica e dental da Università degli Studi di Milano Statale (UNIMI), Milão, Itália. Ao Centro de referência para a reabilitação de atrofia maxilares edêntulas e severas da Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milão, Itália.

Referências Bibliográficas



Referências Bibliográficas

- 1- Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J. Ósseo-integração: Histórico de fundo e conceitos atuais. In: Lindh J, Karring T, Niklaus PL, editores. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p 809–820.
- 2- Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo formação óssea adjacente a implantes endosséus. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251-62.
- 3- Block SM, Achong MR. Ósseo-integração. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen EP, Waite PD. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2nd ed. London: BC Decker; 2004. p 189–203.
- 4- Lambert PM, Morris HF, Ochi S. A influência do fumo sobre o sucesso clínico de implantes dentários ósseo-integrados após 3 anos. *Ann Periodontol*. 2000;5(1):79-89.
- 5- Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Lindén U, Lundqvist S, Rundcrantz T, et al. Análise retrospectiva dos fatores associados com falhas de implantes múltiplos na maxila. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(5):462-7.
- 6- Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa K, Yamauchi E, Miyamoto Y. Influência do fumo sobre a falha de implantes ósseo-integrados: uma meta-análise. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(4):473-8.
- 7- INCA. <https://www.inca.gov.br/números-de-câncer> acessado em 12/08/2019
- 8- Planas-Silva MD, Rutherford TM, Stone MC. Prevenção de tumores mamários espontâneos em ratos por ovariectomia tardia. *Câncer Detect Prev*. 2008;32(1):65-71.
- 9- Clines GA, Choksi P, Van Poznak C. Terapia Adjuvante Endócrina e Saúde Óssea em Câncer de Mama. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Oct;13(5):263-73.

- 10- Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest.* 1992;89(1):74–8.
- 11- Burstein HJ, Temin S, Anderson H, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol.* 2014 Jul 20;32(21):2255-69.
- 12- Göbel A, Kuhlmann JD, Link T, et al. Adjuvant tamoxifen but not aromatase inhibitor therapy decreases serum levels of the Wnt inhibitor dickkopf-1 while not affecting sclerostin in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164(3):737-743.
- 13- Bauer M, Bryce J, Hadji P. Aromatase inhibitor-associated bone loss and its management with bisphosphonates in patients with breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2012 20;4:91-101.
- 14- Brufsky AM. Cancer treatment-induced bone loss: pathophysiology and clinical perspectives. *Oncologist.* 2008 ;13(2):187-95.
- 15- Faverani LP, Polo TO, Ramalho-Ferreira G, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):255-265
- 16- Brånemark Pi, Adell R, Breine U, Hansson Bo, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100..
- 17- Fang J, Hall BK. Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anat Embryol (Berl).* 1997;196(5):349-62.
- 18- Levine Ra, Clem D, Beagle J, Ganeles J, Johnson P, Solnit G, Keller Gw. Multicenter retrospective analysis of the solid-screw ITI implant for posterior single-tooth replacements. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 17(4):550-6.

- 19- Coelho Pg, Granato R, Marin C, et al. The effect of different implant macrogeometries and surface treatment in early biomechanical fixation: an experimental study in dogs. *J Mech Behav Biomed Mater.*, 2011 Nov;4(8):1974-81.
- 20- Zupnik J, Kim Sw, Ravens D, Karimbux N, Guze K. Factors associated with dental implant survival: a 4-year retrospective analysis. *J Periodontol.*, 2011;82(10):1390-5.
- 21- Pan J, Shirota T, Ohno K, et al: Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(8):877-82.
- 22- Giro G, Gonçalves D, Sakakura CE, Pereira RM, Marcantonio Ju nior E, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around ósseointegrated implants: Radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008 Feb;105(2):162-7.
- 23- Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around ósseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2011 Mar;22(3):259-64.
- 24- Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology*. 1989;125(2):825–33.
- 25- Duarte PM, César-Neto JB, Gonçalves PF, et al. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: A histometric study in rats. *Implant Dent* 2003;12(4):340-6.

- 26- Qi MC, Zhou XQ, Hu J, et al: Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(3):279-85
- 27- Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, et al: Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Apr;87(4):411-8.
- 28- Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, et al. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(1):66-74.
- 29- Cho P, Schneider GB, Krizan K, et al. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. *Implant Dent* 2004 Mar;13(1):79-87.
- 30- Giro G, Sakakura CE, Gonçalves D, et al. the Effects of 17 beta-estradiol and alendronate on the removal torque of ósseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol* 1987;2(2):115-22.
- 31- Viera-Negrón YE, Ruan WH, Winger JN, et al: Effect of ovariectomy and alendronate On implant ósseointegration in rat maxillary bone. *J Oral Implantol* 34:76, 2008
- 32- Motohashi M, Shirota T, Tokugawa Y, et al: Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;34(2):76-82.
- 33- Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992 Sep;18(3):227-36
- 34- Kilkeny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. The ARRIVE Guidelines Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments *Br J Pharmacol.* 2010 Aug;160(7):1577-9.

- 35- Matheus HR. Influência da Cisplatina na ósseointegração de implantes de titâneo: estudo histológico e histométrico. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
- 36- Hilakivi-Clarke L, Wärrri A, Bouker KB, et al. Effects of In Utero Exposure to Ethinyl Estradiol on Tamoxifen Resistance and Breast Câncer Recurrence in a Preclinical Model. *J Natl Câncer Inst.* 2016;8;109(1).
- 37- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-14.
- 38- Vilela MG; Santos Júnior JL ; Silva JGC. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. *Femina* 2007;35(10):667-670.
- 39- Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas.* 2016;87:5-17
- 40- Dubois D, Dubois E.F. A formula to estimate the approximate surface área if height and weight be known. *Arch. Intern. Med.* 1989;5(5):303-11.
- 41- Nakasato, T.; Izumisawa, M.; Akahane, A, et al. Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Jpn J Radiol.v.* 2012;30(9):752-61.
- 42- Du Z, Ivanovski S, Hamlet SM, Feng JQ, Xiao Y. The Ultrastructural Relationship Between Osteocytes and Dental Implants Following Ósseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(2):270-80.
- 43- Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014;90:13-29.
- 44- Pearce ST, Liu H, Jordan VC. Modulation of Estrogen Receptor α Function and Stability by Tamoxifen and a Critical Amino Acid (Asp-538) in Helix 12. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7630-8.

- 45- Gnudi S, Giardino R, Mongiorgi R, Fini M, Zati A, Figus E, Monti S, Ripamonti C. Evaluation of an experimental model of osteoporosis induced in the female rat through ovariectomy. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1993;69(7-8):461-8.
- 46- Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res.* 1987;2(2):115-22.
- 47- Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 1988;123(2):681-6.
- 48- Christiansen C, Christensen MS, Larsen NE, Transbøl IB. Transbol. Pathophysiological mechanism of estrogen effect on bone metabolism: dose-response relationship in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982 Dec;55(6):1124-30.
- 49- Stock JL, Coderre JA, Mallette LE. Mallette. 1985. Effects of a short course of estrogen on mineral metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985;61(4):595-600.
- 50- Jordan VC, Phelps E, Lindgren JU. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1987;10(1):31-5.
- 51- Turner RT, Wakley GK, Hannon KS, et al. Tamoxifen inhibits osteoclast mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone-deficient rats. *Endocrinology.* 1988;122(3):1146-50.
- 52- Turken S, Siris E, Seldin D, et al. Effects of tamoxifen on spinal bone density in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81(14):1086-8
- 53- Love RR, Mazess RB, Barden HS, et al. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med.* 1992 26;326(13):852-6.
- 54- Giovannacci I, Meleti M, Corradi D, Vescovi P. Clinical Differences in Autofluorescence Between Viable and Nonvital Bone: A Case Report With

Histopathologic Evaluation Performed on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. J Oral Maxillofac Surg. 2017 ;75(6):1216-1222.

- 55- Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol.* 2006 Jun;7(6):508-14.
- 56- Curral C, Cardoso CL, Júnior OF. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir. Bras* 2016;31(5)
- 57- Landis WJ, Jacquet R. Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcif Tissue Int.* 2013;93(4):329-37
- 58- Soares-Lopes LR, Soares-Lopes IM, Filho LLL, Alencar AP , da Silva BB. Morphological and morphometric analysis of the effects of intralesional tamoxifen on keloids. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017; 242(9): 926–929.
- 59- Condi FLF, Soares JM, Teodoro WPR, Veloso AP, Parra ER, Simões MJ, Baracat EC. The effects of conjugated estrogen, raloxifene and soy extract on collagen in rat bones. *Climacteric.* 2012;15(5):441-8
- 60- Baloğlu M, Gökalp Özkorkmaz E. Biochemical and immunohistochemical investigations on bone formation and remodelling in ovariectomized rats with tamoxifen citrate administration. Folia Morphol (Warsz). 2019.
- 61- Takeuchi M, Tokin M, Nagata K. Tamoxifen directly stimulates the mineralization of human osteoblast-like osteosarcoma cells through a pathway independent of estrogen response element. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 ;210(2):295-301
- 62- Tzaphlidou M, Zaichick V. Calcium, phosphorus, calcium-phosphorus ratio in rib bone of healthy humans. *Biol Trace Elem Res.* 2003;93(1-3):63-74.
- 63- Gandolfi MG, Zamparini F, Iezzi G, Degidi M, Botticelli D, Piattelli A, Prati C. Microchemical and Micromorphologic ESEM-EDX Analysis of Bone Mineralization at the Thread Interface in Human Dental Implants Retrieved for

Mechanical Complications After 2 Months to 17 Years. Int J Periodontics Restorative Dent. 2018 ;38(3):431-441

64- Gil LF, Suzuki M, Janal MN, Tovar N, Marin C, Granato R, Bonfante EA, Jimbo R, Gil JN, Coelho PG. A human retrieval study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;103(6):1328-32.:

65- Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1987;2(2):69-75.

Relevância Clínica

Fundamentação para o estudo: A influência do Tamoxifeno sobre a remodelação óssea periimplantar ainda não está elucidado. Um modelo animal pode auxiliar a avaliar o efeito do TAM sob o tecido ósseo periimplantar no período de tratamento

Principais conclusões: O Tamoxifeno exerce influência positiva no tecido ósseo periimplantar. **Implicações práticas:** O Tamoxifeno exerce influência positiva em quadros de ausência de estrogênio

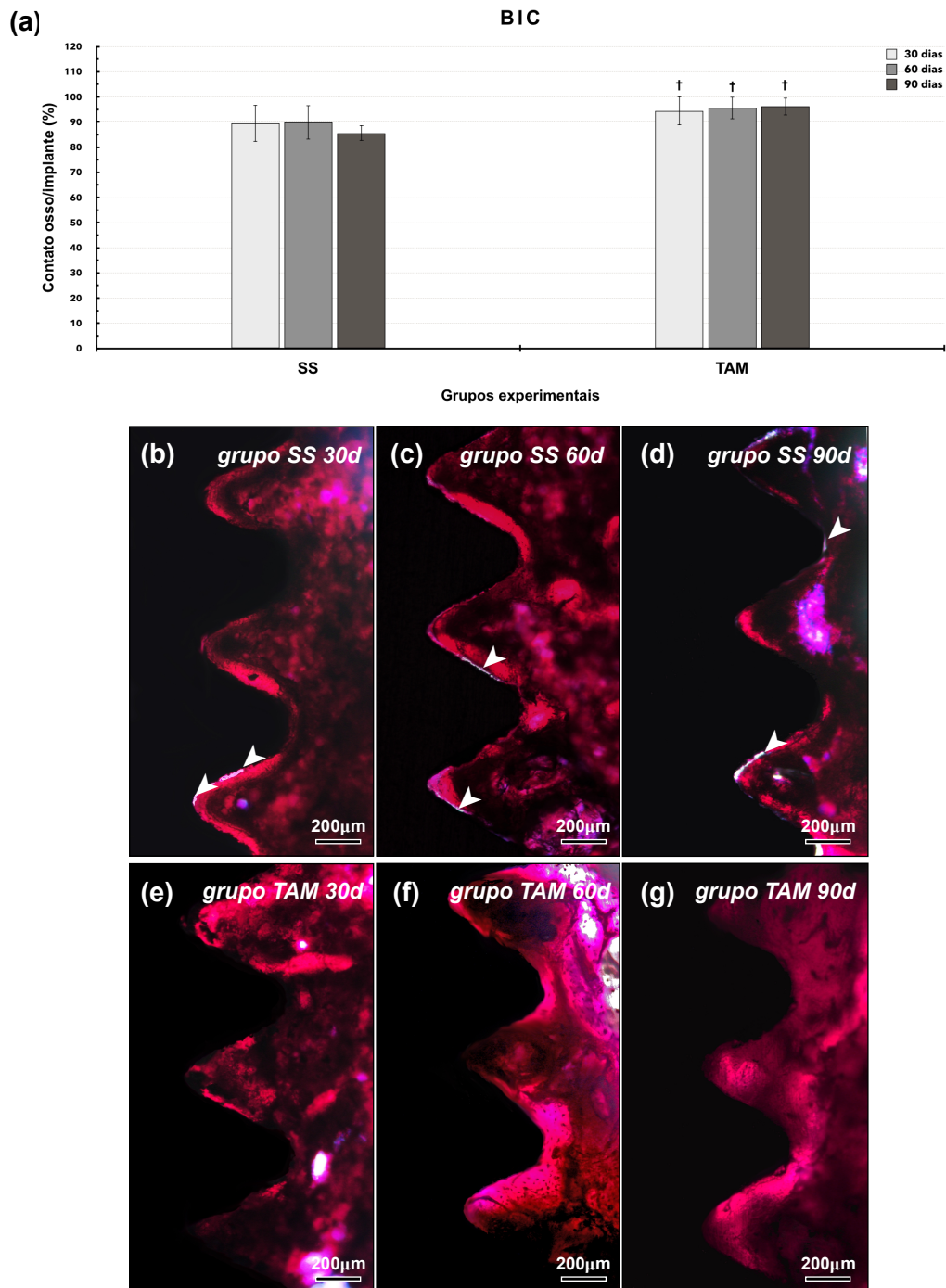


Figura 1: Contato osso/implante para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de contato osso/implante (BIC) na região peri-implantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de BIC nos grupos SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Setas brancas: regiões sem contato osso/implante. Coloração: fucsina básica. Barras de escala: 200 µm.

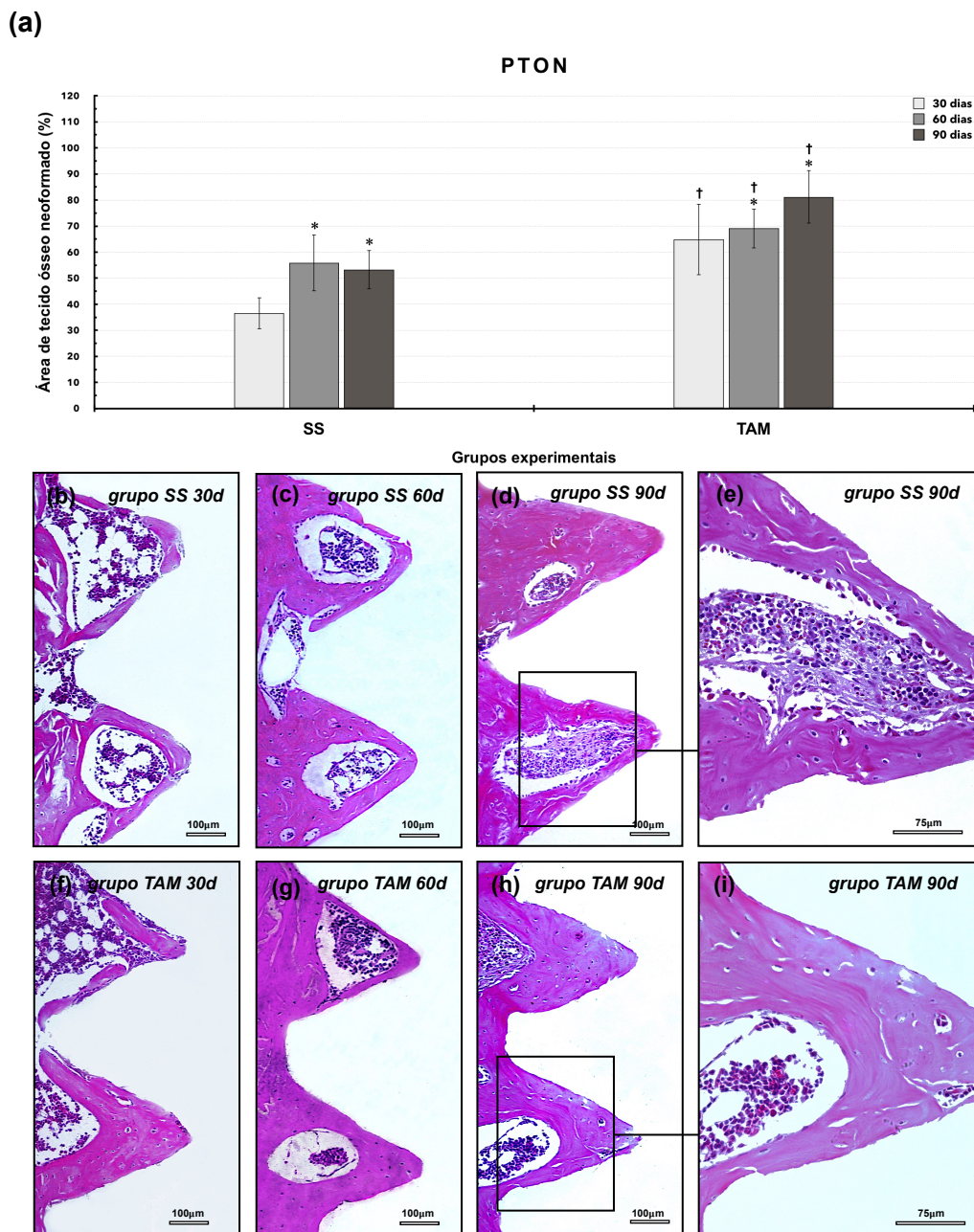


Figura 2: Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) na região peri-implantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo TAM no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-i) fotomicrografias mostrando as características histológicas dos tecidos peri-implantares nos grupos SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d,e), TAM 30d (f), TAM 60d (g) e TAM 90d (h,i). Coloração: hematoxilina e eosina. Barras de escala: b, c, d, f, g, h: 100 μ m; e, i: 75 μ m.

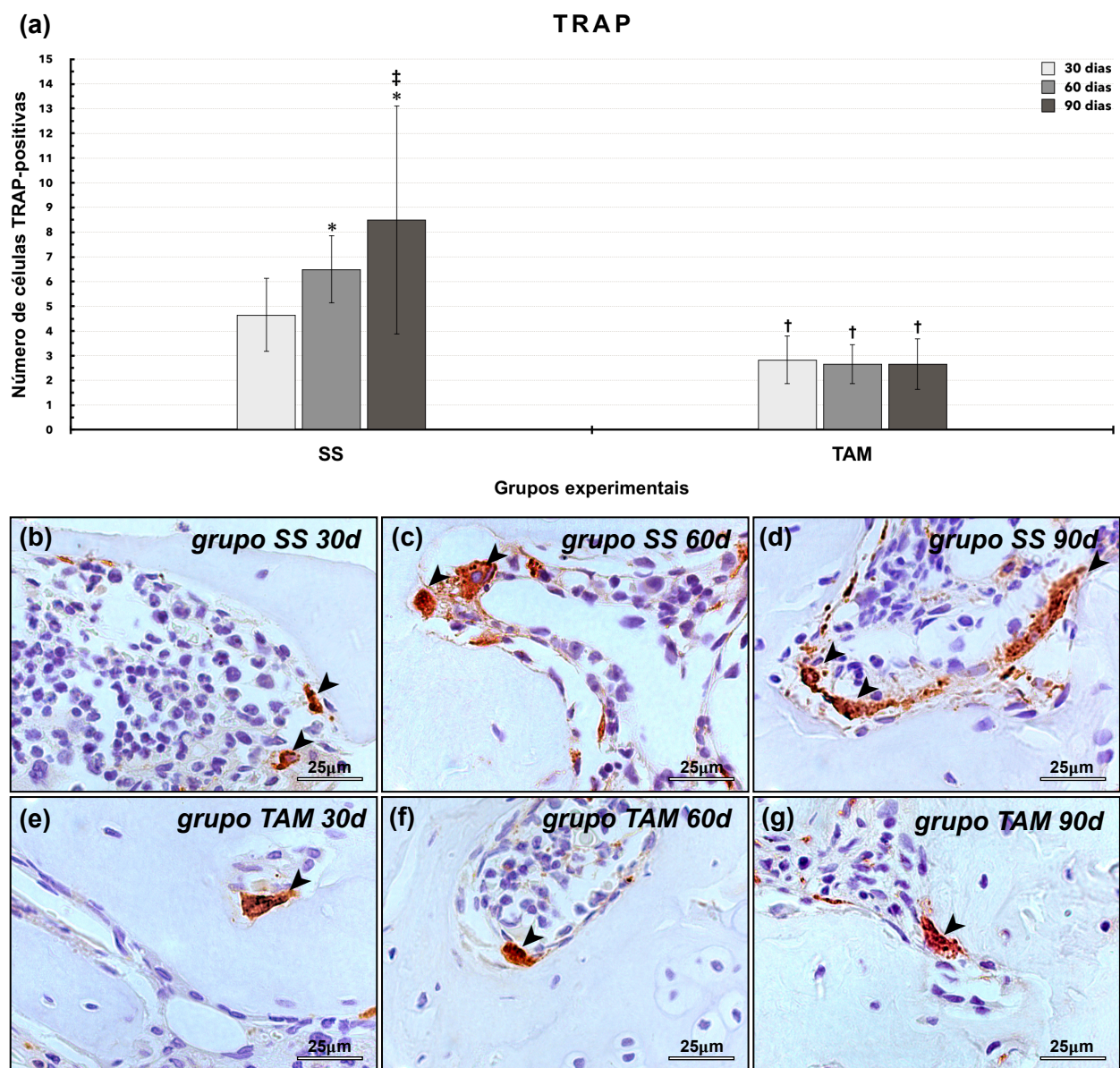


Figura 3: Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão (M±DP) da contagem de células TRAP-positivas. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com 60 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP e células TRAP-positivas (*setas pretas*) em SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μ m.

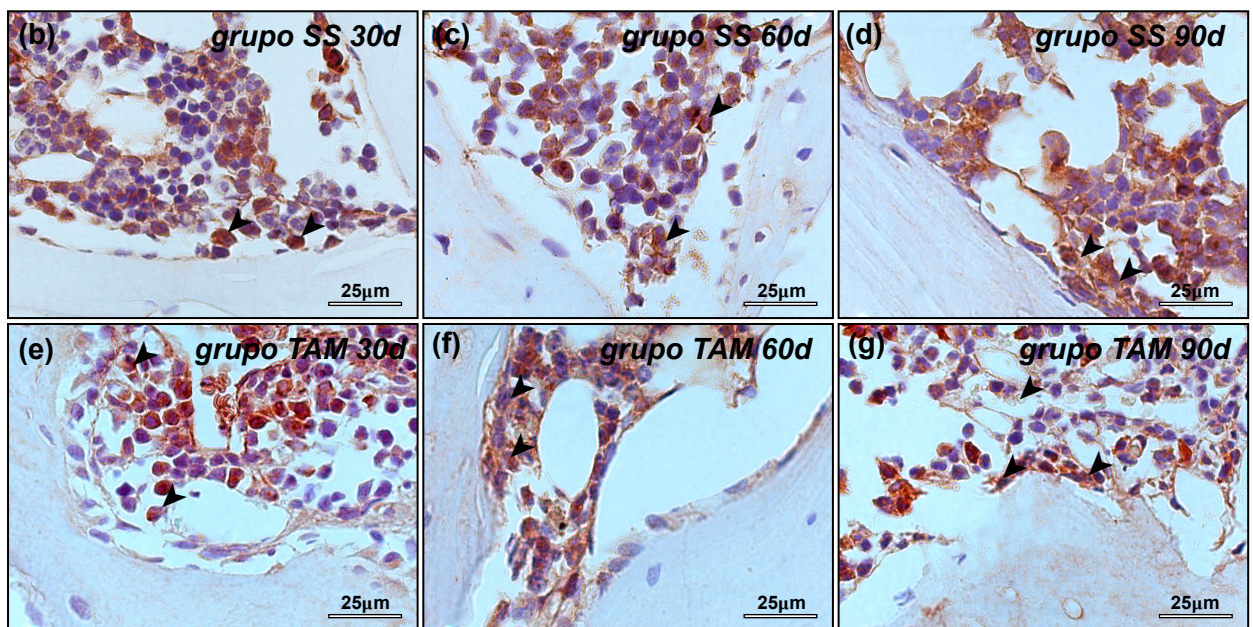
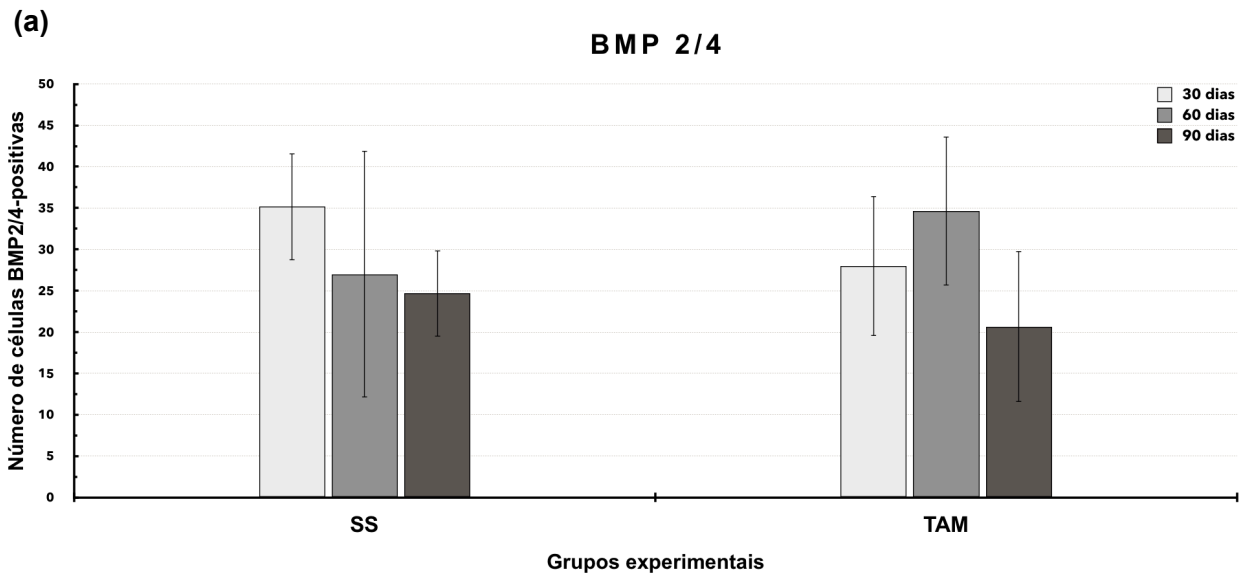


Figura 4: Padrão de imunomarcção de BMP2/4 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células BMP2/4-positivas. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 e células BMP2/4-positivas (*setas pretas*) em SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μ m.

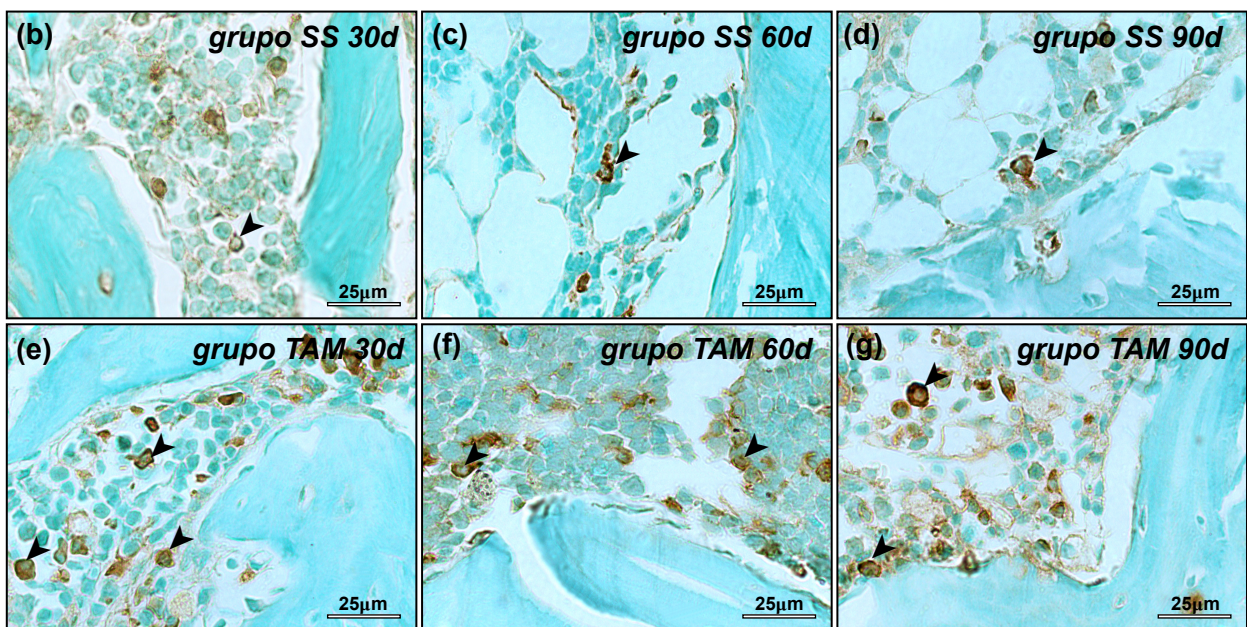
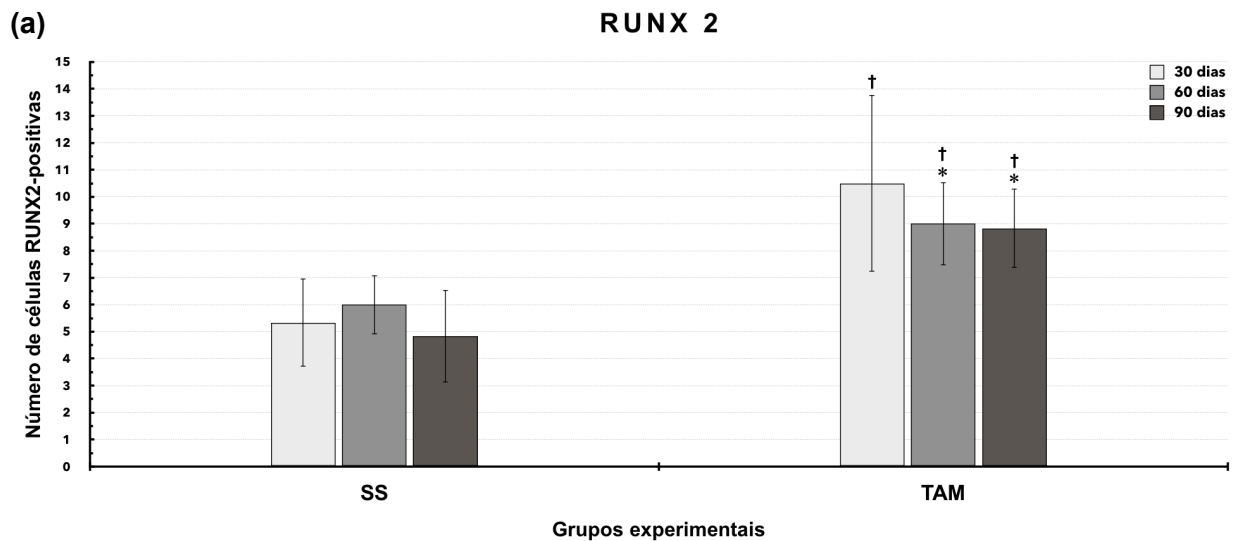


Figura 5: Padrão de imunomarcção de RUNX2 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células RUNX2-positivas. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para RUNX2 e células RUNX2-positivas (*setas pretas*) em SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Contra coloração: fast green. Barras de escala: 25 μ m.

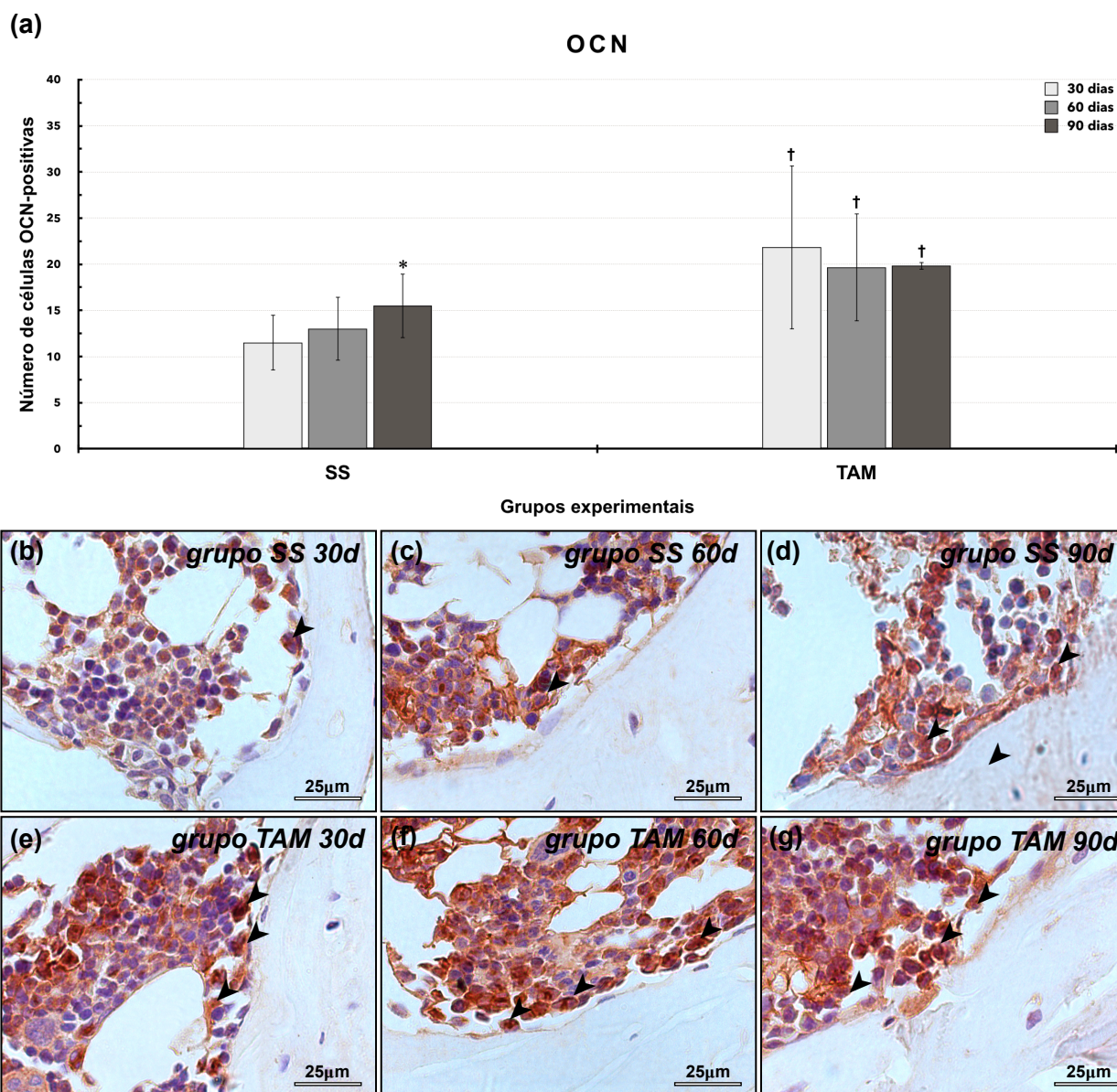


Figura 6: Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células OCN-positivas. Teste estatístico: ANOVA e Bonferroni. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OCN e células OCN-positivas (*setas pretas*) em SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μ m.

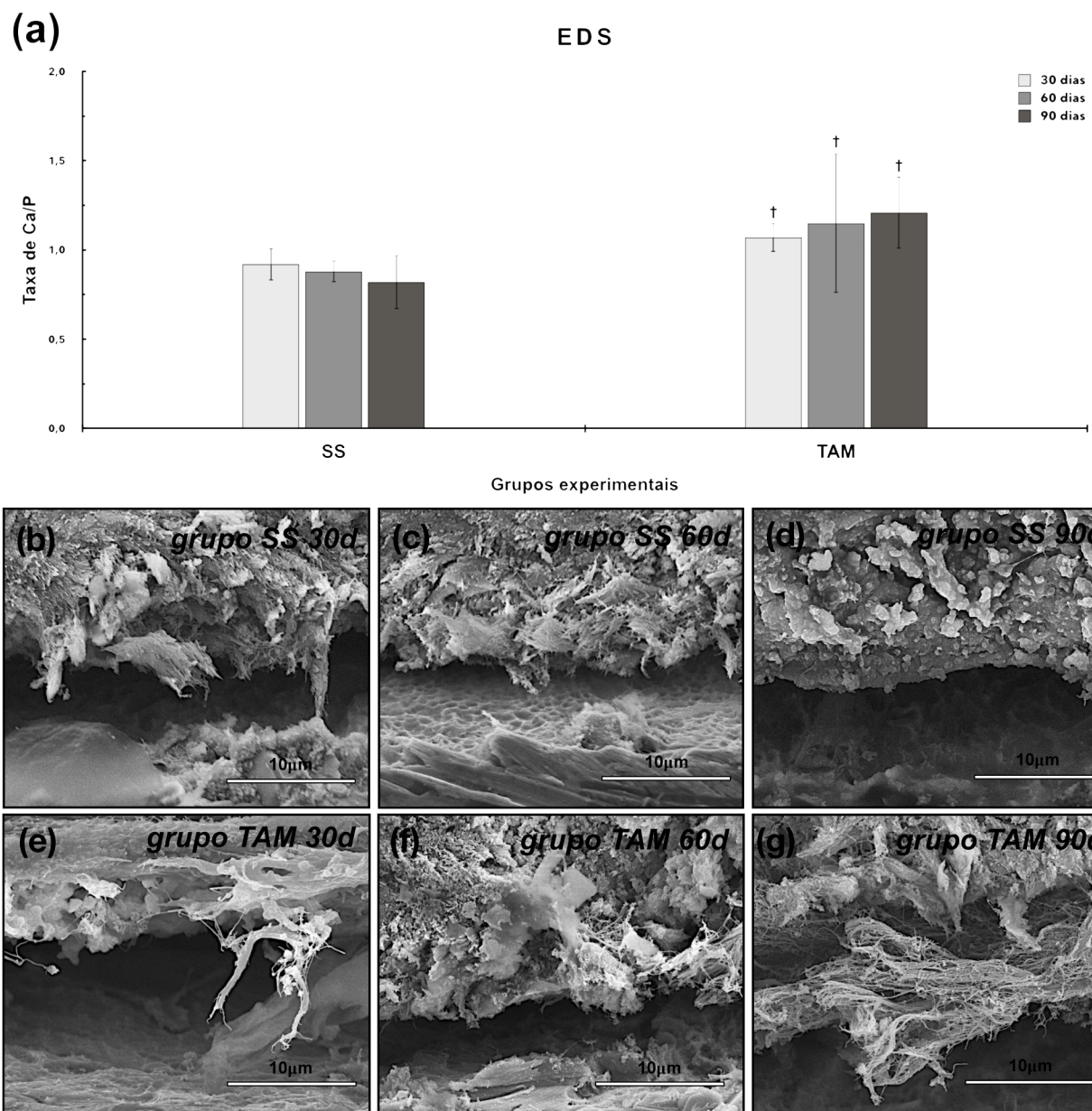


Figura 7: Análise elementar e ultraestrutural dos tecidos peri-implantares. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da taxa de cálcio/fosfato para cada grupo e período. †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS no mesmo período ($p \leq 0,05$) (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de estruturação dos tecidos peri-implantares nos grupos SS 30d (b), SS 60d (c), SS 90d (d), TAM 30d (e), TAM 60d (f) e TAM 90d (g). Aumento original: 2000

Anexo A - Normas para Publicação segundo o Periódico - Journal of Periodontology.

Author Guidelines

Journal of Periodontology Author Instructions

Manuscript Categories

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related áreas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the problem being addressed.
- Methods: Describes how the study was performed.
- Results: Describes the primary results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject área and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors

should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

REVIEW ARTICLES

The *Journal of Periodontology* is no longer accepting submissions of reviews. Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgment(s)

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to [*Clinical Advances in Periodontics*](#). The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures,

drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science. The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication.

The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research. (U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the clinical situation being discussed.
- Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- Results: Describes the clinical results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the cases should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal of Periodontology*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the *Journal of Periodontology* and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 30 days to respond to the observations.

Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management.

Letters should be brief (<1,000 words), focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals.

Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

SEARCH ENGINE OPTIMIZATION

For tips on Search Engine Optimization (SEO) and article discovery, please see our [SEO guide](#).

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to identify authors and their corresponding institutions);
3. disclaimers, if any;
4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers submitted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited. All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>. The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.

11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html>.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology's* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPORTING INFORMATION

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see **Figures** above) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary Videos

The Journal of Periodontology publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail julie@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on ScholarOne Manuscripts in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and

assigning them the Symbol font.

- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Form

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in [ScholarOne Manuscripts](#)** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a **[CONSORT checklist](#)** with your manuscript. More information can be found at www.consort-statement.org.

All clinical trials must be registered prior to submission to the *Journal of Periodontology* at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictpr/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was

approved by the author's institutional experimentation committee or was conducted in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at [ScholarOne Manuscripts](#) by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log in to Author Services where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print on the journal's website. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed in an issue of the *Journal of Periodontology* approximately 4 to 6 months after acceptance.

Copyright Transfer Agreement (CTA)

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution Non-Commercial License
- Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License
- Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to

publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and RCUK requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading.

Funding Agency Requirements

Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660.

Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

Production queries regarding accepted papers can be emailed to jperprod@wiley.com.

Anexo B: Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA)



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Influência do tamoxifeno na remodelação óssea periimplantar"**, Processo FOA nº 00520-2017, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Junho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 04 de Outubro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Novembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of tamoxifen on peri implant bone remodeling"**, Protocol FOA nº 00520-2017, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 14, 2017.

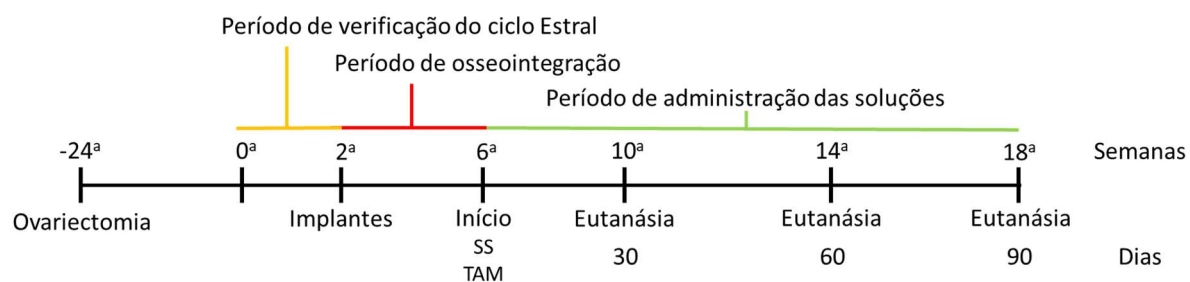
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 04, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 04, 2020.

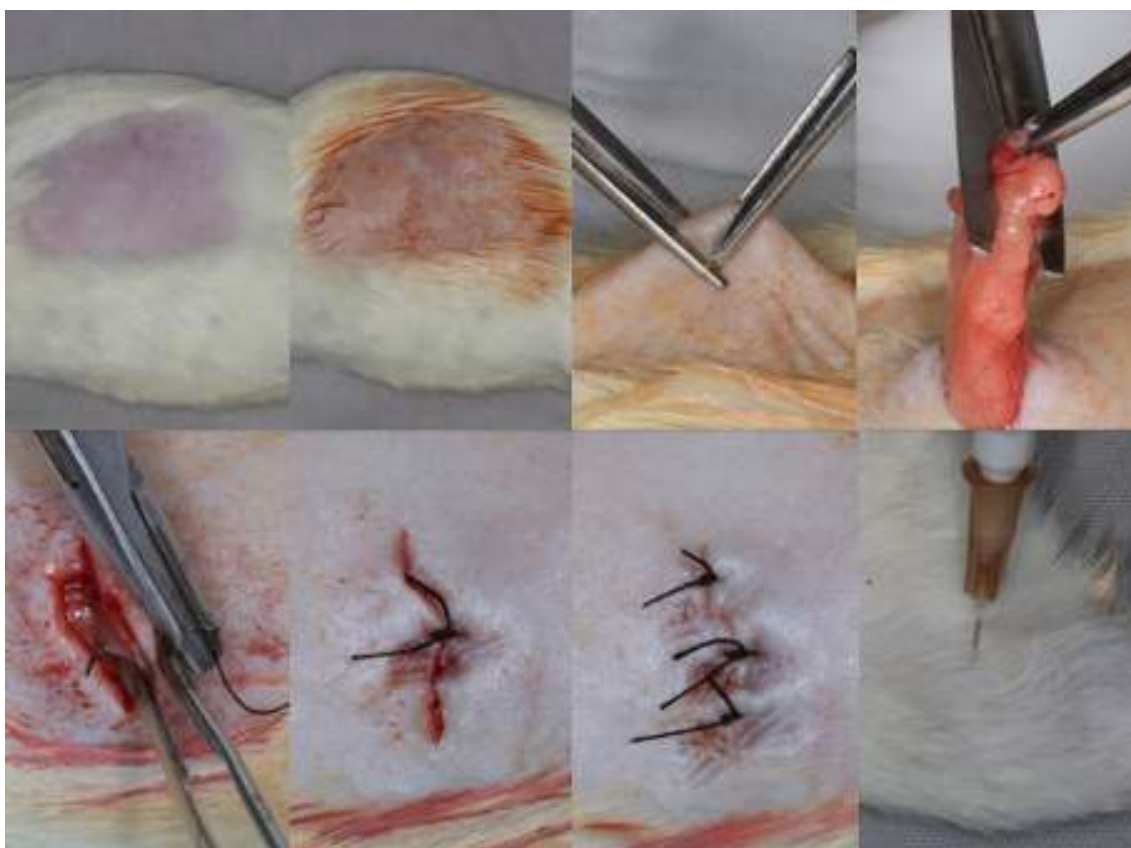
Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

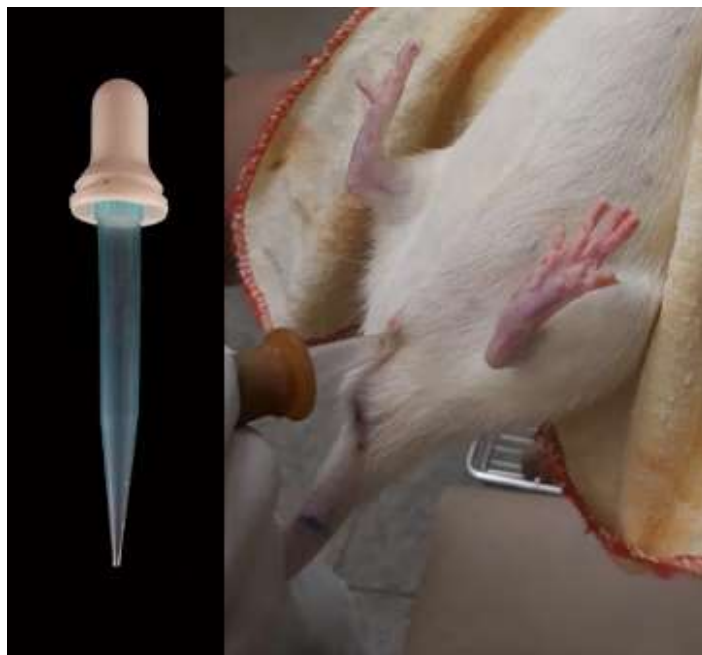
Anexo C: Delineamento Experimental



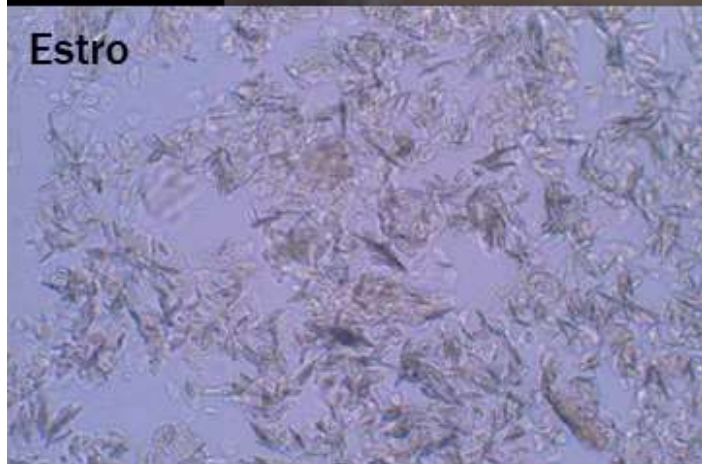
Anexo D: Protocolo para Ovariectomia



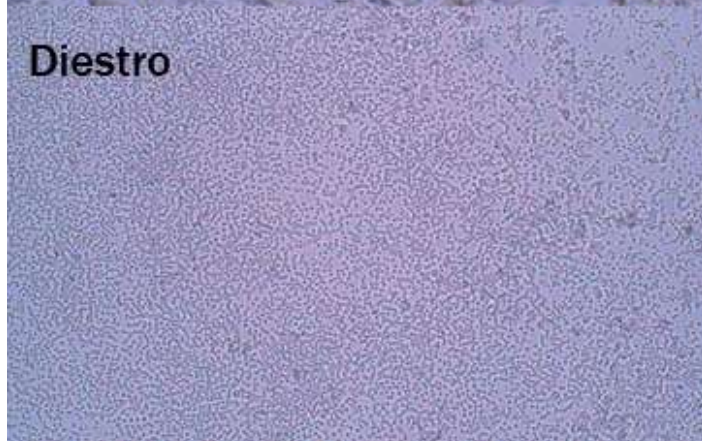
Anexo E: Protocolo para Determinação do Ciclo estral



Estro



Diestro



Anexo F: Protocolo para Administração das Soluções por Gavagem



Anexo G: Protocolo para Instalação dos Implantes

