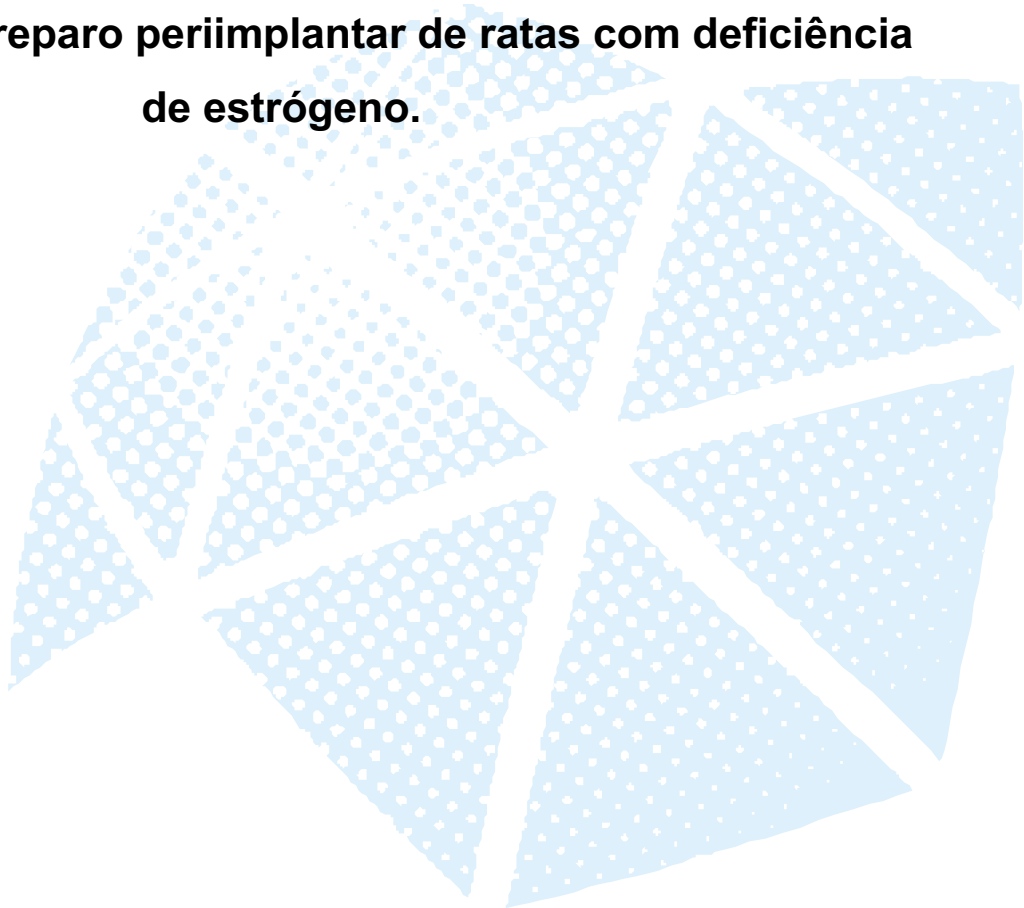


ODIR NUNES DE OLIVEIRA FILHO

***Rubus coreanus* na funcionalização da superfície de implantes:
impacto sobre o reparo periimplantar de ratas com deficiência
de estrógeno.**



ODIR NUNES DE OLIVEIRA FILHO

***Rubus coreanus* na funcionalização da superfície de implantes:
impacto sobre o reparo periimplantar de ratas com deficiência
de estrógeno.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Professora Dra. Roberta Okamoto.

Coorientador: Professor Dr. Paulo Roberto Botacin

Araçatuba – SP

2024

Dedico este trabalho à minha família, em reconhecimento por todo o apoio incondicional que me deram ao longo dos anos e pelo ímense amor que possuem por mim.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof.Dr. **Alberto Carlos Botazzo Delbem** e ao vice-diretor Prof. Dr. **Luciano Tavares Angelo Cintra**.

A minha Orientadora Professora Roberta Okamoto, sou extremamente grato a senhora por ter me acolhido e me orientado durante esses 5 anos de graduação. Obrigado por acreditar em mim, me motivar e possibilitar minha experiência internacional na pesquisa. A senhora é minha inspiração de pessoa, inteligência, elegância e esforço. Sua dedicação e empenho pela pesquisa são admiráveis. Espero ter a oportunidade de poder continuar trabalhando com a senhora em projetos futuros.

Ao meu Coorientador Professor Paulo Roberto Botacin, muito obrigado por todos os ensinamentos que são para além da graduação, obrigado pelas risadas e receitas compartilhadas, o senhor será inesquecível para mim.

Ao Professor Aldiéris Alves Pesqueira, muito obrigado por aceitar o convite de ser banca avaliadora, me sinto muito feliz em ter o senhor fazendo parte dessa etapa. Admiro sua maneira de lidar com os problemas, sempre concentrando-se em encontrar soluções que sempre são surpreendentemente eficazes. Obrigado por todos os ensinamentos de clínica e conselhos pessoais. O senhor fez eu me apaixonar pelo universo chique das cerâmicas odontológicas.

A Doutoranda Naara Gabriela Monteiro, muito obrigado por toda ajuda, por todo apoio e por toda experiência que você compartilhou comigo durante meus anos de graduação no laboratório. Obrigado pelos meetings pré apresentação de trabalho em congressos e por toda sua paciência em me ensinar. Você tem uma garra enorme e tenho certeza de que seu futuro será brilhante.

A Professora Kathryn Grandfield, thank you for all the support you gave me, your patience and care in teaching made my experience abroad smoother and more stimulating. The opportunity to learn with your research group at McMaster was a unique experience that taught me a lot. Learning how to perform and interpret electron microscopy analyses applied to bone tissue was extremely beneficial for me and our research group. I hope to see you again soon.

Ao Professor Fellippo Ramos Verri, obrigado pelos ensinamentos e pela oportunidade de participar da clínica de implantodontia, onde aprendi muito e me

apaixonei pela especialidade. Seu extenso conhecimento na reabilitação oral é admirável e uma inspiração para mim.

A professora Ana Teresa Maluly Proni, muito obrigado por toda sua experiência compartilhada comigo, obrigado por permitir que eu acompanhasse casos clínicos com você, onde tive a oportunidade de aprender técnicas e instrumentais que serão inesquecíveis. Sua habilidade em ensinar com firmeza, mas de uma maneira leve e divertida, é encantadora.

A minha Família, aos meus pais, que mesmo com todas as dificuldades, sempre me apoiarem e foram o meu alicerce, sem vocês nada disso seria possível. Devo todo a honra e respeito a vocês. Aos meus tios e minha avó, que torcem por mim e vibram a cada conquista. Ao Bruno que esteve comigo durante grande parte da minha graduação, dedicando-se a me apoiar e incentivar.

Aos meus amigos Ana Julia Neves Fernandes, Daniel Silva Leão, José Guilherme Pereira Gonçalves, Laura Gabriela Macedo e Sofia Eduarda Novaes de Oliveira por todo companheirismo, lealdade, e diversão que tivemos durante esses todos esses anos, vocês foram cruciais para que cada dia se tornasse mais animado e a rotina mais leve. Vou guardar vocês no coração para o resto da vida, amo vocês.

Aos colegas do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados (LSMT), **Ana Claudia Ervolino da Silva, Fábio Roberto de Souza Batista, Isadora Breseghello, Juliana Moura, Laura Vidoto Paludetto, Leticia Pitol Palin, Nathália Duarte, Paula Buzo Frigério, Pedro Ferreira Gomes, Tatiany Castro, Gabriela Moraes Julião, Isadora Castaldi, Marcelly Braga, e Marina Dutra**, obrigado pelas experiências compartilhadas, colaborações e companheirismo que tivemos.

À **Fundação VUNESP**, por ter me auxiliado com a Bolsa Convênio Secretaria de Estado da Educação-SP, Fundação VUNESP e UNESP; Processo nº1173882/2018; Parecer CEE 119/2019, concedida pelo mérito na classificação do vestibular, durante os anos de 2019 a 2022.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior para realização dessa pesquisa (Processos 2021/12692-0 e 2023/11613-5).

A empresa Titaniumfix pelo fornecimento dos implantes utilizados nessa pesquisa.

Aos **docentes, funcionários, estagiários e pós-graduandos** do Departamento de Ciências Básicas.

Ao **Laboratório Multiusuário** da FOA-UNESP e à FINEP (FINEP/CT-INFRA -
Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011).

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”

Roger Von Oech

RESUMO

OLIVEIRA-FILHO, O.N. *Rubus coreanus* na funcionalização da superfície de implantes: impacto sobre o reparo periimplantar de ratas com deficiência de estrógeno. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

O objetivo desse estudo é investigar a ação local do *Rubus coreanus* (RC) através da funcionalização da superfície de implantes instalados em tíbias de ratas com deficiência de estrógeno. Foram utilizadas 64 ratas Wistar. Os grupos experimentais foram SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200 e OVX RC400 sendo que os animais OVX foram submetidos a ovariectomia bilateral, enquanto os animais SHAM foram submetidos à cirurgia fictícia. Passados 30 dias, todos animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes nas metáfises proximais das tíbias. Os grupos CONV receberam implantes com a superfície convencional vinda de fábrica; os grupos DMSO tiveram as superfícies tratadas com DMSO, os grupos RC200 receberam implantes funcionalizados com 200µg de RC diluídos em 100ml DMSO, e os grupos RC400 receberam implantes funcionalizados com 400µg de RC diluídos em 100ml de DMSO. A eutanásia dos animais ocorreu 28 dias após a instalação dos implantes e as tíbias foram destinadas para as análises de PCR em tempo real (expressão dos genes para ALP, OCN e TRAP); microtomografia computadorizada para avaliação morfométrica do osso formado ao redor dos implantes; imunoistoquímica com o objetivo de detectar a presença das proteínas OCN e TRAP no tecido reparacional; e microscopia eletrônica para avaliação do reparo ósseo em escala nanométrica. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de homocedasticidade para a seleção do teste estatístico apropriado (paramétrico ou não paramétrico), com nível de significância de 5%. A avaliação conjunta dos resultados indica que a funcionalização com RC, em especial o RC200, promove importantes respostas reparacionais sobre o reparo periimplantar tanto em animais SHAM como animais osteopênicos.

Palavras-chave: osteogênese, osteoporose, osseointegração.

ABSTRACT

OLIVEIRA-FILHO, O.N. *Rubus coreanus* in the functionalization of the implant surface: impact on peri-implant repair of rats with estrogen deficiency. Undergraduate thesis - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

The objective of this study is to investigate the local action of *Rubus coreanus* (RC) through the functionalization of the surface of implants installed in the tibias of rats with estrogen deficiency. 64 Wistar rats were used. The experimental groups were SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200 and OVX RC400. The OVX animals underwent bilateral ovariectomy, while the SHAM animals underwent sham surgery. After 30 days, all animals underwent surgery to install implants in the proximal metaphyses of the tibia. The CONV groups received implants with a conventional factory surface; the DMSO groups had their surfaces treated with DMSO, the RC200 groups received implants functionalized with 200µg of RC diluted in 100ml DMSO, and the RC400 groups received implants functionalized with 400µg of RC diluted in 100ml of DMSO. The animals were euthanized 28 days after implant installation and the tibias were used for real-time PCR analysis (gene expression for ALP, OCN and TRAP); microcomputed tomography for morphometric evaluation of the bone formed around the implants; immunohistochemistry with the aim of detecting the presence of OCN and TRAP proteins in the reparative tissue; and electron microscopy to evaluate bone repair on a nanometric scale. Quantitative data were subjected parametric or non-parametric), with a significance level of 5%. The joint evaluation of the results indicates that functionalization with RC, especially RC200, promotes important reparative responses on peri-implant repair in both SHAM and osteopenic animals.

Keywords: osteogenesis, osteoporosis, osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho experimental relacionado a linha do tempo dos procedimentos executados.....	23
Figura 2- A imagem BSE-SEM do implante (branco), osso (cinza) e resina (cinza mais escuro), o quadrado amarelo representa o ROI; B Preparação de amostras TEM pelo FIB incluindo cortes abertos em ambos os lados da área de interesse, protegidas por deposição de Tungstênio; C levantamento da lamela utilizando micro manipulador; D fixação da amostra à grade TEM e desbaste da amostra; E, F e G Imagem HAADF-STEM de amostra desbastada mostrando fibras de colágeno mais organizadas (osso antigo) e fibras de colágeno menos organizadas (osso novo).	28
Figura 3- Imunomarcacão de OCN para o grupo SHAM.	34
Figura 4- Imunomarcacão de OCN para o grupo OVX.....	35
Figura 5- Imunomarcacão de TRAP para o grupo SHAM	36
Figura 6- Imunomarcacão de TRAP para o grupo OVX	37
Figura 7- Imagem BSE-SEM da interface entre implante e osso. As setas pretas indicam áreas de fissuras na interface osso-implante.	38
Figura 8- Mosaico de imagens BSE-SEM para cada amostra com implante voltado para a metáfise distal da tíbia.	39
Figura 9- Mosaico de imagens BSE-SEM para cada amostra com o implante voltado para a metáfise proximal da tíbia.....	39
Figura 10- Imagem HAADF-STEM da interface entre osso novo (NB) e osso antigo (OB). A) SHAM CONV. B) SHAM RC200. As setas brancas indicam uma fibra colágena.	42
Figura 11- Imagens HAADF-STEM para o grupo SHAM CONV. Da esquerda para a direita: ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo, ampliação ainda maior da interface mostrando uma interface semelhante a uma linha de cimento altamente mineralizada, ampliação maior da interface mostrando fibras de colágeno alinhadas no limite e osso menos organizado em ambos os lados.	42
Figura 12- Imagens HAADF-STEM para o grupo SHAM RC200. Da esquerda para a direita: Ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo, ampliação ainda maior da interface mostrando fibras de colágeno organizadas no osso antigo, ampliação maior do osso novo com rápida formação de colágeno desorganizada.	43

Figura 13- Imagens HAADF-STEM para o grupo OVX RC200. Da esquerda para a direita: Ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo.43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a proteína ALP. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	30
Gráfico 2- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a proteína OCN. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	31
Gráfico 3- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a enzima TRAP. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	31
Gráfico 4- Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	32
Gráfico 5- Quantificação da superfície de intersecção. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	33
Gráfico 6- Quantificação da densidade de conectividade. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400.....	33
Gráfico 7- Resultados obtidos para o BIC (μm) através das imagens SEM-BSE dos oito grupos analisados.....	40
Gráfico 8- Resultados obtidos para BA (μm^2) através das imagens SEM-BSE dos oito grupos analisados.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos experimentais.....	20
Tabela 2- Scores para imunomarcção de OCN e TRAP para os diferentes grupos experimentais.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ALP	Fosfatase alcalina
BA	Bone Area
BIC	Contato osso-implante
BSE	Backscattered Electrons
BV	Volume Ósseo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONN.DEEN	Densidade de Conectividade
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIB	Microscopia de Feixe de Íons Focado
HAADF-STEM	Campo Escuro Anular de Alto Ângulo por Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão
i.S	Superfície de Intersecção
Kv	Quilovolt
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
nm	Nanômetro
OCN	Osteocalcina
OVX	Ovariectomia
PBS	Solução de tampão fosfato salina
PVPI	Polivinilpirrolidona-iodo
RC	<i>Rubus coreanus</i>
ROI	Região de interesse
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SEM-BSE	Microscopia Eletrônica de Varredura no modo de retroespalhamento de elétrons
SEM-FIB	Microscopia Eletrônica de Varredura por Feixe De Íons Focados
SHAM	Cirurgia Fictícia
STEM	Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão

TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UV-C	Luz ultravioleta
μA	Microampere
μg	Micrograma
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	1ª. ETAPA – FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES	19
3.2	2ª. ETAPA – EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	20
3.3	ANÁLISES	24
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS	30
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – Comitê de Ética	54

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença sistêmica multifatorial e crônica, afeta principalmente mulheres no período pós-menopausa majoritariamente por causa de seus níveis reduzidos de estrógeno circulante. Essa desordem metabólica acarreta uma deterioração da microarquitetura óssea e concomitantemente aumenta a fragilidade e susceptibilidade a fraturas dos ossos longos^{1,2}. Com o aumento da expectativa de vida, doenças ósseas como a osteoporose e a osteopenia tendem a duplicar até 2040 em relação ao ano de 2010³. Além do mais, tais pacientes procuram cada vez mais por tratamentos orais reabilitadores como a instalação de implantes dentários visando melhorar sua mastigação, fonação e estética. Porém, tem sido reportado na literatura que alterações sistêmicas, como a osteoporose, propiciam um prejuízo para a osseointegração, pois causam um atraso no processo de reparo ósseo ao redor das espiras dos implantes. Em decorrência do atraso na cronologia do reparo ósseo periimplantar, agravos podem suceder o procedimento, prejudicando a estabilidade dos implantes e sucesso do tratamento reabilitador¹.

As terapias farmacológicas destinadas ao tratamento da osteoporose podem ser categorizadas em dois grupos distintos: os agentes antirreabsortivos, os quais atuam na redução ou inibição do processo de reabsorção óssea, e os agentes anabólicos, que promovem a estimulação da formação óssea. Dentre os fármacos antirreabsortivos, destacam-se os Bisfosfonatos, o Denosumab, os Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio (SERMs) e a Calcitonina. Por sua vez, os fármacos anabólicos compreendem principalmente a Teriparatida (PTH 1-34) e o Romosozumabe, um inibidor específico da esclerostina, este último recentemente aprovado pela Food and Drug Administration (FDA)³⁻⁵. Apesar dos diversos fármacos disponíveis no mercado, a primeira linha de escolha terapêutica para a osteoporose geralmente tem sido os antirreabsortivos, em especial a classe dos Bisfosfonatos, pois possuem uma taxa antirreabsortiva muito favorável⁶.

Entretanto tais medicamentos sintéticos podem induzir efeitos colaterais indesejáveis, especialmente os Bisfosfonatos, que inclusive causam certo receio na área odontológica, por propiciarem a ocorrência de osteonecrose dos maxilares^{6,7}. Em busca de alternativas para essas drogas, estudos buscam por terapias naturais que

sejam eficazes, mas que possuam menos efeitos colaterais. Substâncias essas como os fitoestrógenos e o *Rubus Coreanus* (RC)⁸⁻¹².

Uma alternativa terapêutica natural que vem sendo investigada na literatura é o extrato do RC pelo fato de possuir efeitos estrogênicos no tecido ósseo¹¹, um estudo de Valencia-Llano *et al.*¹² mostra o efeito benéfico do extrato de amora em um defeito de tamanho crítico, que pode ser estimulado pela antocianina cianidina-3-rutinosídeo, presente no RC. Além de possuir efeito anti-inflamatório, antiviral, anti-carcinogênese e antioxidante¹⁰, o RC exerce efeito positivo no tecido ósseo pois induz a diferenciação de osteoblastos e apoptose de osteoclastos, aumenta a atividade da fosfatase alcalina (ALP), secreção de osteocalcina (OCN) e colágeno, o que sugere que a atuação do RC proporcione o equilíbrio do processo de remodelação óssea, resultando em um tecido ósseo saudável e com respostas fisiológicas adequadas, o que não ocorre com o uso dos Bisfosfonatos. Portanto, a literatura indica que o RC é capaz de prevenir doenças como a osteoporose, e atuar de forma terapêutica no reparo ósseo.⁸⁻¹²

A funcionalização da superfície dos implantes é um método que vem sendo estudado com o objetivo de proporcionar a distribuição de moléculas de forma local no tecido reparacional periimplantar, minimizando assim os efeitos colaterais advindos de administrações sistêmicas. Há diversas maneiras de modificar a superfície do implante dentre elas o jateamento, o ataque ácido, a anodização, dip-coatings, a técnica layer-by-layer. Os “coatings” podem funcionar como perfeitos transportadores para proteínas osteoindutoras, fatores de crescimento e fármacos com atuação local no tecido ósseo aprimorando as propriedades biológicas e mecânicas periimplantares¹³⁻¹⁹.

Portanto, visto que a implantodontia enfrenta um impasse que ainda tende a aumentar no futuro quando se trata de reparo ósseo periimplantar em condições de deficiência de estrógeno, almejamos nesse trabalho avaliar as respostas reparacionais *in vivo* perante a administração local do RC através da funcionalização da superfície dos implantes em modelos experimentais de ratas saudáveis e deficientes em estrógeno, para assim verificar o efeito local preventivo e terapêutico da substância.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o processo de reparo ósseo periimplantar perante a administração local de *Rubus coreanus*, em diferentes concentrações, através da funcionalização da superfície dos implantes instalados em ratas ovariectomizadas ou saudáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 1ª. ETAPA – FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

Os implantes foram funcionalizados utilizando a técnica de incorporação Dip-coating, que consiste no processo de imersão dos implantes em uma solução a fim de formar camadas ao redor dos implantes. As soluções utilizadas para a funcionalização dos implantes foram Dimetilsulfóxido (DMSO), 200µg de *Rubus coreanus* diluídos em 100ml de DMSO (RC200), e 400µg de *Rubus coreanus* diluídos em 100ml de DMSO (RC400), a dosagem escolhida seguiu um estudo já publicado por Lee *et al.*¹⁹

Implantes de titânio puro, grau IV, baseados no conceito de duplo ataque ácido (Titaniumfix, Brasil) foram expostos à luz UV-C por 15 minutos a fim de promover microrrugosidades em suas respectivas superfícies. Em seguida, os implantes permaneceram em temperatura ambiente para que cada camada pudesse secar completamente. As cinco imersões foram realizadas com o intervalo necessário entre elas para que as superfícies secassem completa e naturalmente. Concluídas as 5 camadas, os implantes foram devidamente armazenados em microtubos.

Devido ao fato de o DMSO ser uma substância aprótica e polar, muitos estudos na literatura o empregam como solvente. O DMSO tem uma taxa de toxicidade relativamente baixa e seu uso tem crescido no campo biológico, especialmente após a aprovação da Food and Drug Administration (FDA). Estudos demonstraram que o DMSO pode influenciar na diferenciação e função das células ósseas²⁰⁻²³, desta forma, os grupos SHAM DMSO e OVX DMSO atuam como controle positivo.

Ambas as concentrações de RC, assim como o DMSO, foram avaliadas no laboratório da profa. Luana Marota Reis de Vasconcelos, no ICT/UNESP, através da funcionalização de discos de titânio. Os resultados indicam que as substâncias não comprometem a viabilidade celular e mantêm as suas características funcionais.

Também foram realizados testes físicos e químicos, sobre a funcionalização da superfície dos implantes, no Laboratório de Materiais Avançados da UNESP de Bauru, coordenado pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho. Os estudos estão em processo de publicação

3.2 2ª. ETAPA – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, Brasil (processo 2020-410). A pesquisa com animais foi conduzida de acordo com as diretrizes da Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE), bem como seguindo o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório fornecido pelo National Institutes of Health (Institute of Laboratory Animal Resources) [EUA]²⁴.

O número amostral para cada grupo foi determinado usando o *power test* através do website <http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm> (OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto), baseado em resultados prévios já publicados²⁵. As médias utilizadas para o cálculo foram 3,06 e 4,898 e os desvios padrões foram 0,26 e 0,024, com nível de significância de 5% e poder de 95% em um teste de hipótese unicaudal.

Foram utilizadas 64 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com quatro meses de idade e peso corporal variando de 250 a 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura ambiente de 22°C, em ciclo de 12h claro/12h escuro, e receberam dieta balanceada (NUVILAB, 1,4% Ca e 0,8% P) e água ad libitum. As ratas foram selecionadas para o experimento após confirmação do ciclo estral regular²⁶. Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais, contendo 8 animais por grupo, de acordo com a condição de deficiência de estrogênio e funcionalização da superfície do implante: SHAM CONV (n=8); SHAM DMSO (n=8); SHAM RC200 (n=8); SHAM RC400 (n=8); OVX CONV (n=8); OVX DMSO (n=8); OVX RC200 (n=8); e OVX RC400 (n=8) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Grupos experimentais.

SHAM CONV	Cirurgia fictícia + implante convencional
SHAM DMSO	Cirurgia fictícia + implante funcionalizado com DMSO
SHAM RC200	Cirurgia fictícia + implante funcionalizado com RC200
SHAM RC400	Cirurgia fictícia + implante funcionalizado com RC400
OVX CONV	Ovariectomia + implante convencional
OVX DMSO	Ovariectomia + implante funcionalizado com DMSO
OVX RC200	Ovariectomia + implante funcionalizado com RC200
OVX RC400	Ovariectomia + implante funcionalizado com RC400

Fonte: Autor, 2024.

3.2.1 OVARIECTOMIA

Os animais ficaram em jejum durante oito horas prévias ao procedimento de ovariectomia, foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Xylazine - Coopers, Brasil, Ltda.) e cloridrato de cetamina (Cloridrato de Cetamina Injetável, Fort Dodge, Animal Health Ltd.) e imobilizados em mesa cirúrgica em decúbito lateral. Para acesso à cavidade abdominal foi realizada incisão de 1cm nos flancos, divulsão do tecido subcutâneo por planos e em seguida do peritônio. Os ovários e cornos uterinos foram localizados e posteriormente laqueados com fio Polyglactin 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Em seguida, os ovários foram retirados e realizada a sutura em planos com Polyglactin 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). As ratas do grupo SHAM foram submetidas ao mesmo procedimento, porém foi realizada apenas a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários, sem sua respectiva ligadura e remoção, para submetê-las ao mesmo estresse cirúrgico das ovariectomizadas. Como medida profilática após a cirurgia, 0,2ml de antibiótico veterinário (Penicilina com Estreptomicina 1.200.000 UI) foram injetados por via intramuscular em todos os animais. Os ratos foram submetidos à avaliação diária do ciclo estral para confirmar a eficácia do procedimento²⁶.

3.2.2 CIRURGIA PARA INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Decorridos 30 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral os animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes. Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico, sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil), além disso, receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, e antisepsia da região a ser incisada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise proximal da tíbia esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e

afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para a instalação do implante.

Foram instalados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Titaniumfix, Brasil), com diâmetro de 2,2mm e altura de 4mm, esterilizados por raios gama, submetidos ou não à funcionalização das superfícies com o DMSO ou RC. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 0,9 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 2,0mm, com travamento e estabilidade inicial.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise proximal da tíbia. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

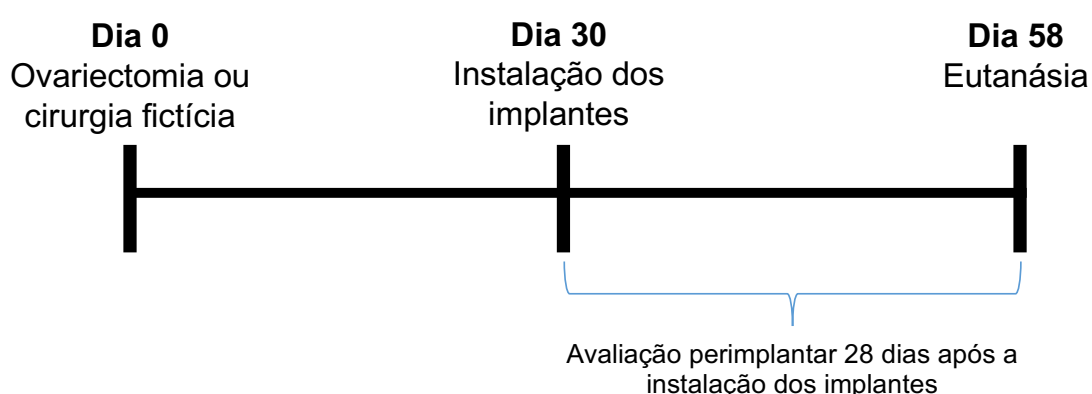
No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

3.2.3 EUTANÁSIA

Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias a eutanásia e sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório. Após a sedação foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, e antissepsia da região a ser incisada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear de

aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o implante. Os implantes presentes nas tíbias do lado direito foram removidos e imediatamente o tecido ósseo em contato com as espiras dos implantes foi coletado para realização análise de PCR tempo real, com o intuito de avaliar a expressão relativa de genes envolvidos no reparo ósseo periimplantar. As tíbias do lado contralateral foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) por 48 horas, seguida de lavagem em água corrente por 24 horas. Foram posteriormente destinadas ao escaneamento através do microtomógrafo computadorizado (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) e após o armazenamento das imagens reconstituídas e o processamento pelos softwares para avaliação morfométrica do tecido ósseo reparacional, parte das amostras foram destinadas ao processamento laboratorial para a realização da análise imunoistoquímica e a outra parte seguiu para o processamento laboratorial para inclusão em resina e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Microscopia de Feixe de Íons Focados (FIB) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) para avaliação da ultraestrutura óssea.

Figura 1- Desenho experimental relacionado a linha do tempo dos procedimentos executados.



Fonte: Autor, 2024.

3.3 ANÁLISES

3.3.1 RT-PCR

A análise de PCR foi conduzida para investigar a expressão de genes associados ao processo de reparo periimplantar. Foram utilizadas placas de PCR previamente projetadas pela fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para amplificar genes relacionados à formação óssea e mineralização. Cada fragmento ósseo contendo osso reparacional foi lavado com solução salina tamponada e congelado em nitrogênio líquido para extrair o RNA total usando Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após avaliação da integridade, pureza e concentração do RNA, realizamos a transcrição reversa do cDNA utilizando 1 µg de RNA e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). O cDNA obtido foi então aplicado em placas de PCR com Taqman Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para detectar genes relacionados ao reparo ósseo. A PCR em tempo real foi realizada no sistema Step One Plus (Applied Biosystems) seguindo um protocolo padrão de ciclos de temperatura²⁷. A expressão gênica relativa foi determinada utilizando a expressão do gene da proteína ribossomal mitocondrial como referência e normalizada pela expressão gênica de fragmentos ósseos em reparo em diferentes condições experimentais (método $\Delta\Delta CT$). O experimento foi replicado em quadruplicata. Os genes analisados incluíram Fosfatase Alcalina (ALP), Osteocalcina (OCN) e Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), com Beta-actina ($\beta 2$ -Microglobulina, B2M) como controle constitutivo.

3.3.2 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

As tíbias do lado contralateral ao lado em que foi realizado o PCR foram removidas após a eutanásia, fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, banhadas em água corrente por 24 horas, armazenadas em álcool 70° até a realização da microtomografia computadorizada (Micro-CT).

Os parâmetros avaliados seguiram o guia para a avaliação da microarquitetura óssea em roedores usando microtomografia computadorizada publicado por Bouxsein *et al.*²⁸.

As amostras foram escaneadas através do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 8µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.4mm, tamanho do pixel de 2016x1344µm e com tempo de aquisição de 1h e 56min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 5, correção dos anéis de artefato de 10, correção de Beam Hardening de 40% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas, sendo avaliada no plano transaxial.

Para realização das morfometrias o 3D foi utilizado o software CTAnalyser (Skyscan, Leuven, Bélgica). A padronização da região de interesse (ROI) foi padronizada através da metodologia BIC envolvendo a região de osso periimplantar em contato com o implante. A partir da utilização da metodologia BIC, foram demarcados 30 slices correspondentes à porção medular, a partir do desaparecimento da cortical superior e aparecimento de osso medular.

A partir dessa conversão o software realizou o cálculo morfométrico aplicado ao ROI por meio dos parâmetros: Volume ósseo (BV); Superfície de intersecção (i.S); Densidade de conectividade (Conn.Dn)²⁸.

3.3.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Após a microtomografia computadorizada, parte das amostras foram desmineralizadas em Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por um período de 2 meses. Após mais 24 horas de lavagem em água corrente, as amostras foram desidratadas, e incluídas em parafina. Os implantes foram removidos no momento da inclusão em parafina. As amostras de tecido foram então cortadas longitudinalmente ao longo do eixo do implante até atingir uma espessura de 6 micrômetros, e essas fatias foram montadas em lâminas histológicas.

Para análise imunoistoquímica, foram utilizados anticorpos primários para Osteocalcina (OCN, cabra anti-OCN; Santa Cruz Biotecnologia) e Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP, cabra anti-TRAP; Santa Cruz Biotecnologia). Um anticorpo anti-cabra de burro biotilado (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) serviu como anticorpo secundário. As reações

imunoistoquímicas foram potencializadas usando um sistema avidina-biotina (Kit ABC-Vectastain Elite ABC – padrão de peroxidase, apenas reagente A e B – PK6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), com diaminobenzidina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) empregado como cromógeno. As reações de controle foram realizadas para avaliar a especificidade do rótulo e a contra coloração foi obtida com hematoxilina.

A análise dos dados foi realizada de forma qualitativa, com pontuações variando de “0” indicando ausência de imunomarcagem, e “1, 2 e 3” representando imunomarcagem mínima, moderada e intensa, respectivamente, de acordo com estudos publicados anteriormente²⁹⁻³¹.

3.3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Após a Micro-CT, as tíbias foram desidratadas com uma série graduada de etanol (70–80–90–100%). Em seguida, as tíbias foram infiltradas em solução de acetona e metilmetacrilato MMAL (Classic, Classic Dental Articles, São Paulo, SP, Brasil) na proporção de 1:1, seguida de banhos de metilmetacrilato. O catalisador peróxido de benzoíla a 1% (Riedel - De Haën AG, Seelze - Hannover, Alemanha) foi adicionado ao último banho.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro com tampa e mantidos à temperatura de 37°C por 5 dias até a polimerização da resina. Após a polimerização, os blocos contendo as amostras foram inicialmente reduzidos com broca “Maxicut” montada em motor de bancada Kota (Strong 210, São Paulo, SP, Brasil), paralelamente ao longo eixo da tíbia (plano sagital). Em seguida, foi realizado o desgaste manual progressivo em polidora metalográfica (polidora metalográfica PL02E 2 velocidades, Teclago, SP, Brasil) com lixas de granulação 120, 320, 400, 600, 800 e 1200 (folha abrasiva 3M Wetordry), até a espessura de 2mm medida por paquímetro digital (Mitutoyo, Pompeia, SP, Brasil).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) foi realizada para visualizar a interface osso/implante e determinar regiões de interesse (ROI) para análises microscópicas adicionais. Para a preparação, as amostras foram limpas e revestidas com uma fina camada de carbono (~20nm) para melhorar sua condutividade. Adicionalmente, para mitigar o acúmulo de cargas no topo das amostras, uma fina camada de pasta de prata foi aplicada para conectar a base do implante ao suporte da amostra. O modo de retroespalhamento de elétrons (SEM-BSE) foi empregado

para diferenciar o implante do tecido ósseo através do contraste de composição baseado na massa atômica. As imagens BSE-SEM foram adquiridas utilizando FEI Magellan 400 XHR (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, EUA), operado com tensão de aceleração de 10kV e distância de trabalho de 6–6,5mm.

As imagens SEM-BSE para cada amostra foram unidas usando o software Fiji³² com objetivo de avaliar qualitativamente o contato osso-implante (BIC) e a área óssea (BA). Após a obtenção das imagens SEM-BSE e armazenamento em formato TIFF, elas foram analisadas utilizando o software ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Universidade de Wisconsin/NIH, EUA). O BIC foi calculado através do perímetro de contato osso-implante utilizando a ferramenta “straight”, e o cálculo da BA foi realizado utilizando a ferramenta “freehand selection”, para medir a área óssea na região trabecular em contato com o implante, medida em pixels³³. As análises foram realizadas em ambos os lados do implante e apenas a região de osso trabecular foi avaliado³⁴.

Em seguida, as imagens foram utilizadas para identificar a interface osso antigo/novo próximo ao implante para a preparação da amostra para análise FIB e STEM. O ROI nas regiões periimplantares foi indicado para retirada da amostra para análises posteriores usando microscópio eletrônico de transmissão.

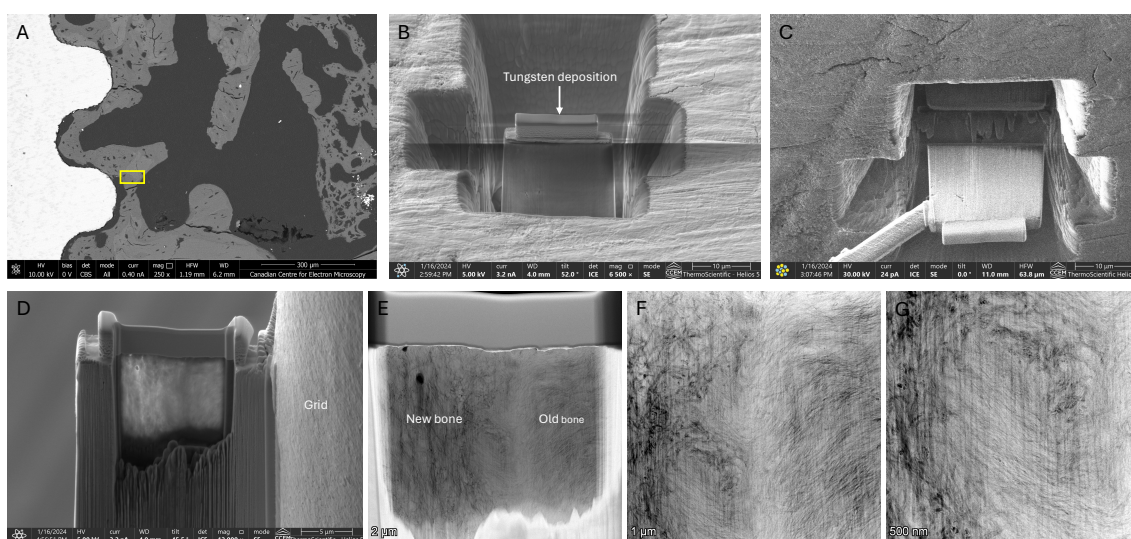
3.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR FEIXE DE ÍONS FOCADOS (SEM-FIB)

A preparação da amostra foi realizada utilizando FIB-SEM (Helios 5 UC Dual Beam, Thermo Scientific). Inicialmente, uma camada metálica foi aplicada por pulverização catódica para proteger a amostra de danos potenciais por feixes de elétrons e íons. Em seguida, uma camada de tungstênio (2,5 micrômetros) foi depositada na amostra usando um feixe de íons seguido de fresagem de trincheiras e levantamento do ROI. O lift-out foi transferido para a grade TEM, onde o preparo foi finalizado com uma fase de limpeza³⁵. Através desta fase final, a lamela TEM foi exposta a um feixe FIB de gálio operando a 2kV e 0,19nA por um breve período de cada lado. Esta etapa garantiu a remoção de quaisquer contaminantes ou resíduos acumulados, deixando a amostra pronta para análise TEM de alta resolução³⁶.

A área de interesse na interface osso antigo/novo foi selecionada próxima ao implante (**Figura 2A**), uma camada de tungstênio de 2,5nm foi depositada para proteger a amostra do corte (**Figura 2B**), a amostra foi retirada usando um micro

manipulador (**Figura 2C**), transferida para uma grade TEM e cortada para transparência eletrônica usando correntes decrescentes de feixe de íons (**Figura 2D**) e finalmente analisada através de STEM (**Figura 2E F e G**)³⁶.

Figura 2- A imagem BSE-SEM do implante (branco), osso (cinza) e resina (cinza mais escuro), o quadrado amarelo representa o ROI; B Preparação de amostras TEM pelo FIB incluindo cortes abertos em ambos os lados da área de interesse, protegidas por deposição de Tungstênio; C levantamento da lamela utilizando micro manipulador; D fixação da amostra à grade TEM e desbaste da amostra; E, F e G Imagem HAADF-STEM de amostra desbastada mostrando fibras de colágeno mais organizadas (osso antigo) e fibras de colágeno menos organizadas (osso novo).



Fonte: Autor, 2024.

3.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR TRANSMISSÃO (STEM)

A Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (TEM) é uma ferramenta que possui diversas técnicas adequadas para estudar o processo de osseointegração e remodelação óssea. Neste trabalho, foram utilizadas imagens para observar a interface entre o osso antigo e o novo e avaliar como a funcionalização do implante com RC afetou a fisiologia e ultraestrutura do novo osso, através da imagem do arranjo mineral ósseo e do colágeno.

As imagens de Campo Escuro Anular de Alto Ângulo por Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (HAADF-STEM) da lamela foram adquiridas a 200kV (Talos 200X, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Este modo de imagem, semelhante ao BSE em SEM, possui contraste composicional onde a intensidade é escalonada com o número atômico ao quadrado. Portanto, regiões mais brilhantes representam maior conteúdo mineral. STEM também nos permite visualizar bandas de colágeno, bandas claras e escuras distintas de 67nm que indicam a orientação do

colágeno na amostra. Essas técnicas de imagem possibilitaram avaliar de forma qualitativa o processo de reparo ósseo entre os grupos a partir de uma perspectiva ultraestrutural e analisar o efeito do RC no reparo ósseo.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

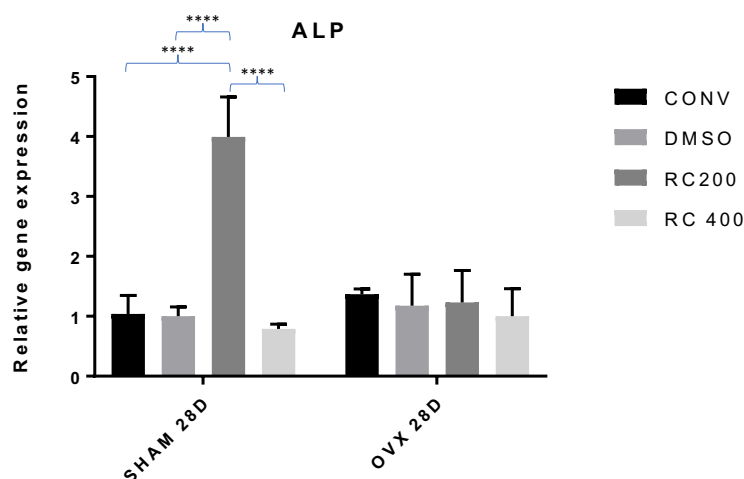
Os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade e homocedasticidade (teste de Shapiro-Wilk) que foi utilizado para avaliar a distribuição das amostras, que foram paramétricas. Após confirmação de sua distribuição normal, o teste Anova Two Way foi seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.01 para Windows. Para todos os dados foi considerado nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 PCR

A análise de PCR em tempo real mostrou a expressão de genes importantes para o metabolismo ósseo durante o processo de reparo periimplantar. Foram coletadas as amostras aos 28 dias pós-operatórios, e neste período foi possível observar que a expressão gênica relativa para ALP, a enzima que induz a precipitação de fosfato sobre a matriz óssea, teve maior expressão na superfície RC200 para o grupo SHAM, com diferença estatística quando comparado as demais superfícies nos animais SHAM.

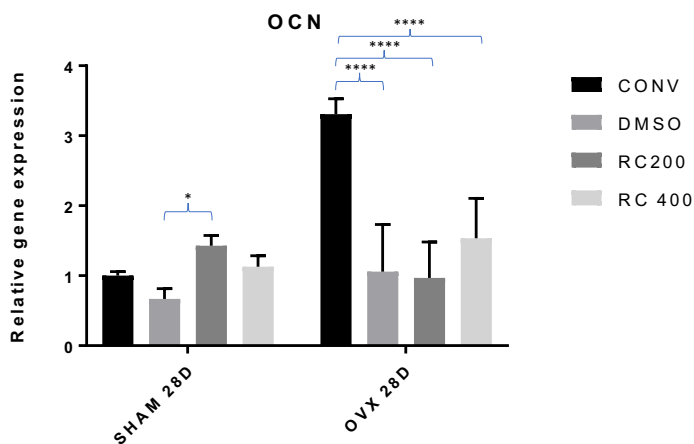
Gráfico 1- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a proteína ALP. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400



Fonte: Autor, 2024.

Para a proteína não colágena OCN, que sinaliza a mineralização óssea, observou-se um aumento significativo na superfície RC200 em relação à DMSO no grupo SHAM. Para o grupo OVX, observou-se um aumento significativo da superfície convencional em relação às demais ($P < 0,0001$). (**Gráfico 2**).

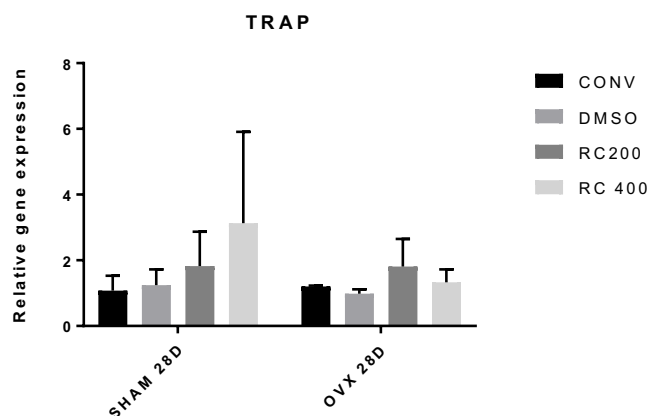
Gráfico 2- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a proteína OCN. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400



Fonte: Autor, 2024.

A expressão gênica relativa para TRAP, que induz reabsorção óssea, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos analisados, bem como para as diferentes superfícies ($P < 0,0001$). (**Gráfico 3**).

Gráfico 3- Expressão gênica relativa para o gene que codifica para a enzima TRAP. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400

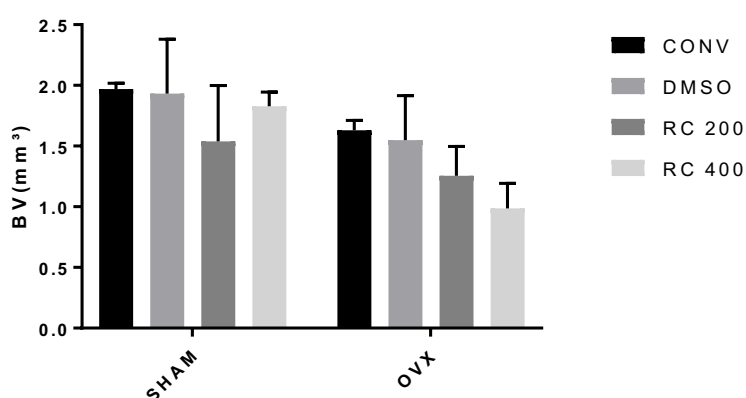


Fonte: Autor, 2024.

4.2 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

Os valores obtidos para o parâmetro Volume Ósseo (BV) foram: SHAM CONV (1,96 mm³), OVX CONV (1,63 mm³), SHAM DMSO (1,91 mm³), OVX DMSO (1,55 mm³), SHAM RC200 (1,54 mm³), OVX RC200 (1,25 mm³), SHAM RC400 (1,82 mm³) e OVX RC400 (0,98 mm³). Para o parâmetro volume ósseo não houve diferença estatística entre os grupos estudados. (**Gráfico 4**).

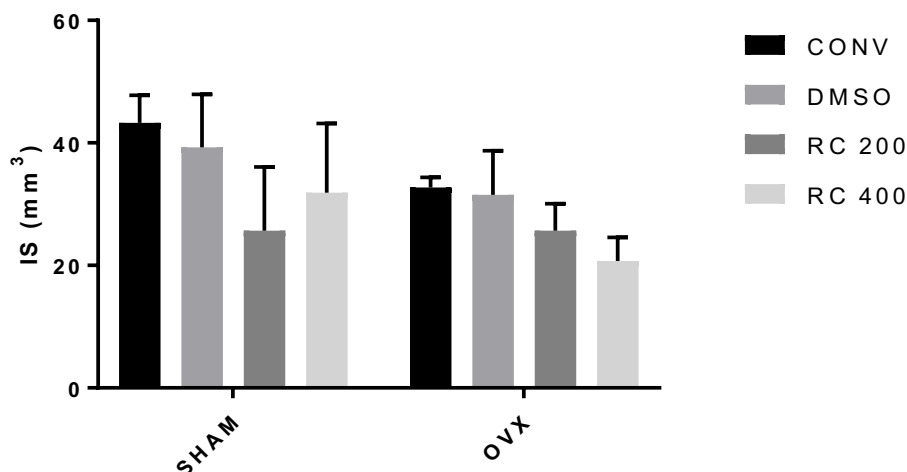
Gráfico 4- Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados obtidos para percentual de Superfície de intersecção (i.S) foram: SHAM CONV (43,29mm²), OVX CONV (32,70mm²), SHAM DMSO (39,27mm²), OVX DMSO (31,51mm²), SHAM RC200 (25,65mm²), OVX RC200 (25,67mm²), SHAM RC400 (31,86mm²) e OVX RC400 (20,70mm²). Para o parâmetro Superfície de Intersecção não houve diferença estatística entre os grupos estudados (**Gráfico 5**).

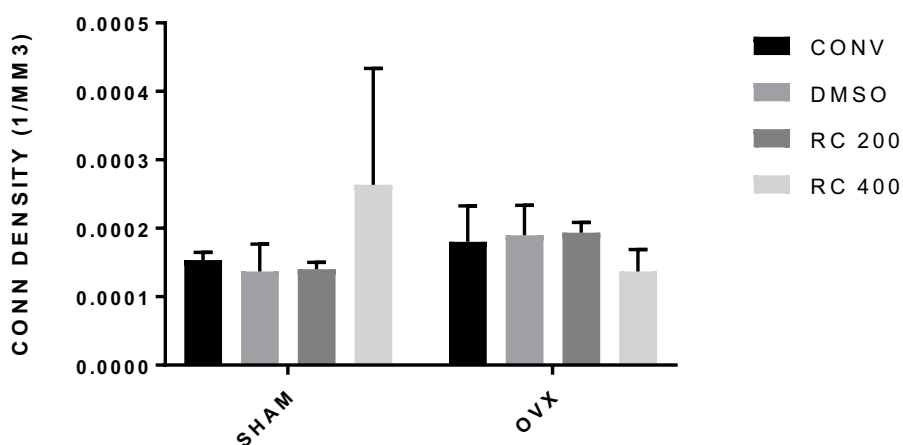
Gráfico 5- Quantificação da superfície de intersecção. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados para densidade de conectividade (Conn.Dn) foram: SHAM CONV (0,000153333mm³), OVX CONV (0,00018mm³), SHAM DMSO (0,000136667mm³), OVX DMSO (0,00019mm³), SHAM RC200 (0,00014mm³), OVX RC200 (0,000193333mm³), SHAM RC400 (0,000263333mm³) e OVX RC400 (0,000136667mm³). Para o parâmetro Densidade de Conectividade não houve diferença estatística entre os grupos estudados (**Gráfico 6**).

Gráfico 6- Quantificação da densidade de conectividade. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC200, SHAM RC400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC200, OVX RC400



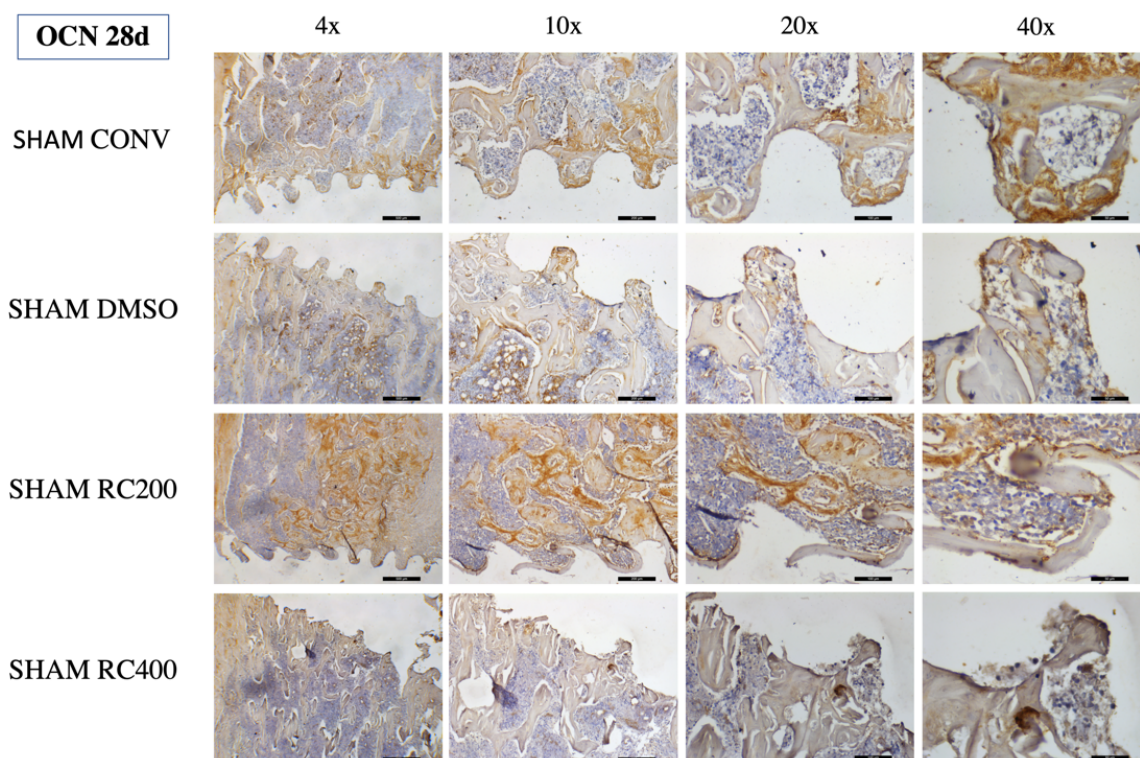
Fonte: Autor, 2024.

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A análise de imunomarcção permitiu que os marcadores importantes para o metabolismo ósseo durante o processo de reparo periimplantar fossem observados na região de interesse para este estudo (tecido ósseo formado junto às espiras de implantes, na região de osso medular). (**Tabela 3**).

Aos 28 dias, observou-se que a osteocalcina, proteína não colágena que se relaciona com o processo de mineralização óssea, presente em células da linhagem osteoblástica assim como precipitada na matriz extracelular, mostrou-se moderada nos grupos SHAM superfície CONV. Mostrou-se discreta nas superfícies DMSO e RC400 para o grupo SHAM. Quanto a superfície RC200, observou-se uma marcação intensa para esta proteína, mostrando importantes regiões de precipitação da osteocalcina no tecido ósseo neoformado, assim como nas células da linhagem osteoblástica. Vale destacar que a superfície RC200 mostrou-se com o melhor padrão reparacional, apresentando importante formação óssea com um grau de maturação tecidual superior às demais superfícies dentro deste grupo experimental. A superfície RC400 mostrou uma melhor quantidade de tecido ósseo neoformado, mostrando uma qualidade tecidual inferior ao grupo convencional (**Figura 3**).

Figura 3- Imunomarcção de OCN para o grupo SHAM.

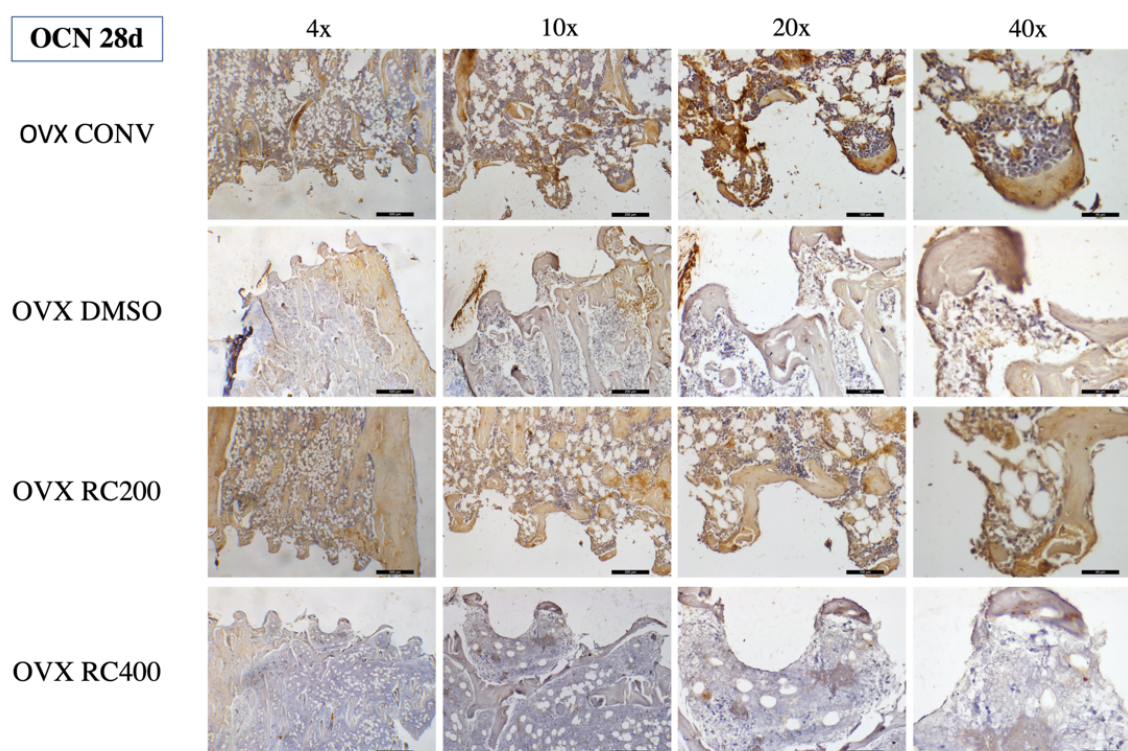


Fonte: Autor, 2024.

No grupo OVX, observou-se a presença de osteocalcina de forma moderada na superfície CONV e de forma intensa na superfície RC200. Na superfície RC200 observa-se uma importante presença de OCN nas células osteoblásticas assim como em regiões da matriz extracelular, além de uma maior formação de tecido ósseo relação às demais superfícies. Quanto a superfície DMSO, observa-se uma discreta presença de OCN no tecido ósseo mineralizado. Quanto a superfície RC400, observa-se uma discreta marcação de OCN e uma menor quantidade de osso formado junto às espiras do implante.

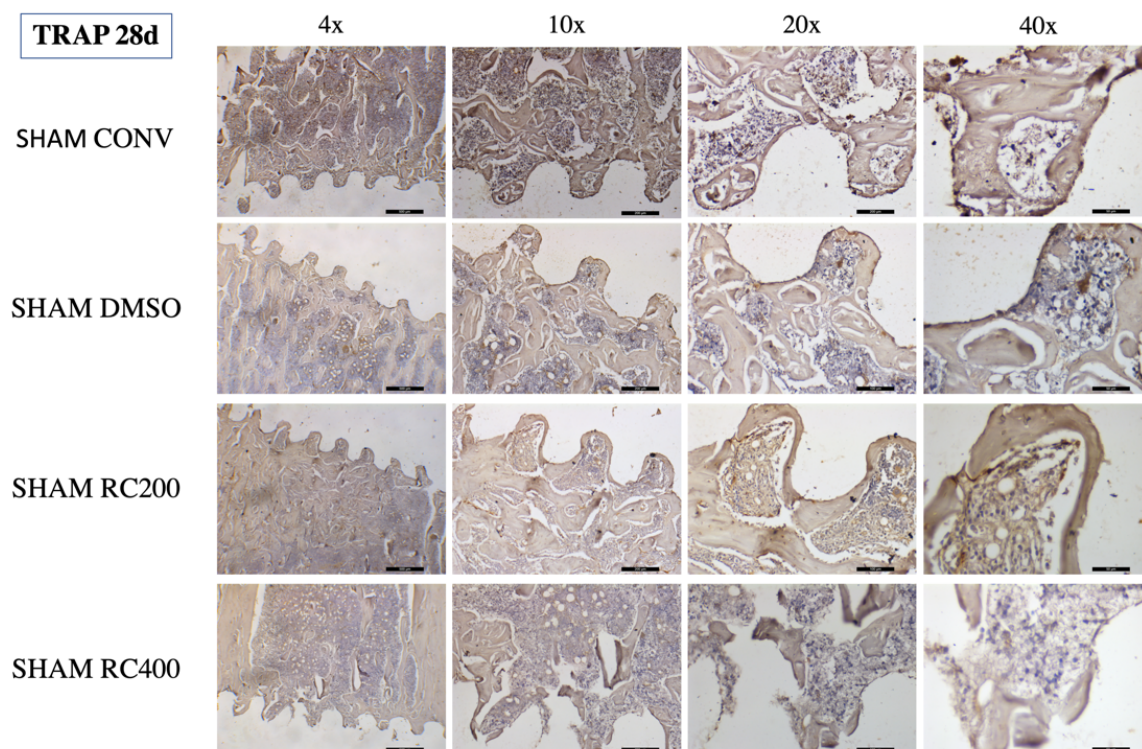
Assim como no grupo SHAM, é possível observar no grupo OVX que o melhor padrão de resposta reparacional foi observado na superfície RC200 em relação às demais superfícies observadas para essa proteína. (**Figura 4**).

Figura 4- Imunomarcagem de OCN para o grupo OVX.



Fonte: Autor, 2024.

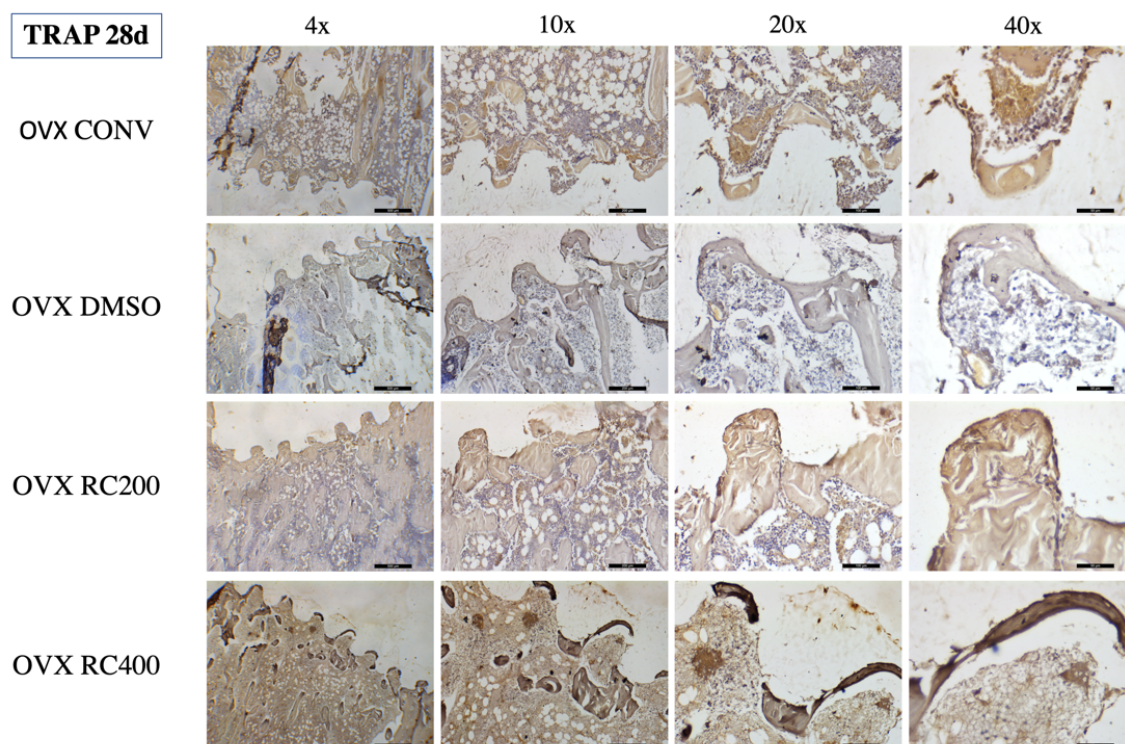
A marcação de TRAP, uma proteína que sinaliza a atividade osteoclástica apresentou-se marcada de forma discreta no grupo SHAM para todas as superfícies avaliadas (**Figura 5**).

Figura 5- Imunomarcação de TRAP para o grupo SHAM

Fonte: Autor, 2024.

No grupo OVX, observou-se a discreta presença de osteoclastos TRAP positivos para as superfícies CONV, DMSO e RC400. No grupo RC200, observa-se uma marcação moderada para TRAP, mostrando osteoclastos em atividade junto ao tecido ósseo neoformado na região das espiras dos implantes. A presença de osteoclastos em atividade nesta superfície confirma a melhor qualidade de tecido ósseo, estando relacionada à maior quantidade de tecido ósseo neoformado, mostrando um grau de maturidade maior do osso reparacional nesta superfície (**Figura 6**).

Figura 6- Imunomarcação de TRAP para o grupo OVX



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 2- Scores para imunomarcação de OCN e TRAP para os diferentes grupos experimentais

	OCN	TRAP
SHAM CONV	2	1
SHAM DMSO	1	1
SHAM RC200	3	1
SHAM RC400	1	1
OVX CONV	2	1
OVX DMSO	1	1
OVX RC200	3	2
OVX RC400	1	1

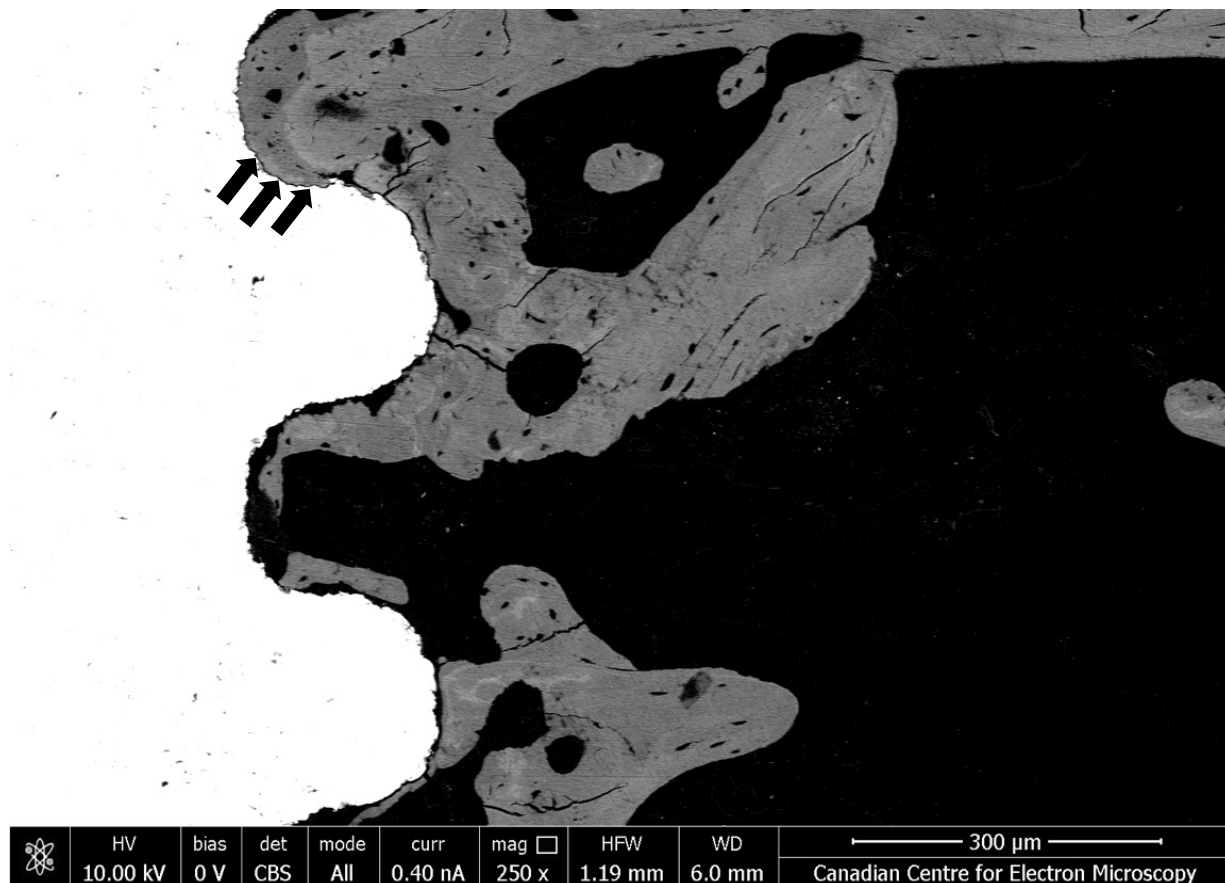
Fonte: Autor, 2024.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM – BSE)

Em ampliações maiores em SEM, podem ser observadas fissuras entre a superfície das roscas do implante e o osso (**Figura 7**). Essas trincas podem ser decorrentes de diversas etapas do processamento, como fixação, inclusão, polimento e polimerização da resina, e esta condição impediu a caracterização da interface osso/implante, principalmente em relação à Microscopia Eletrônica de Transmissão

(TEM), em escalas nanométricas³⁷. No entanto, o contorno uniforme do osso e do implante indica que essas estruturas provavelmente estiveram em íntimo contato antes dos procedimentos de preparação da amostra (**Figura 7**).

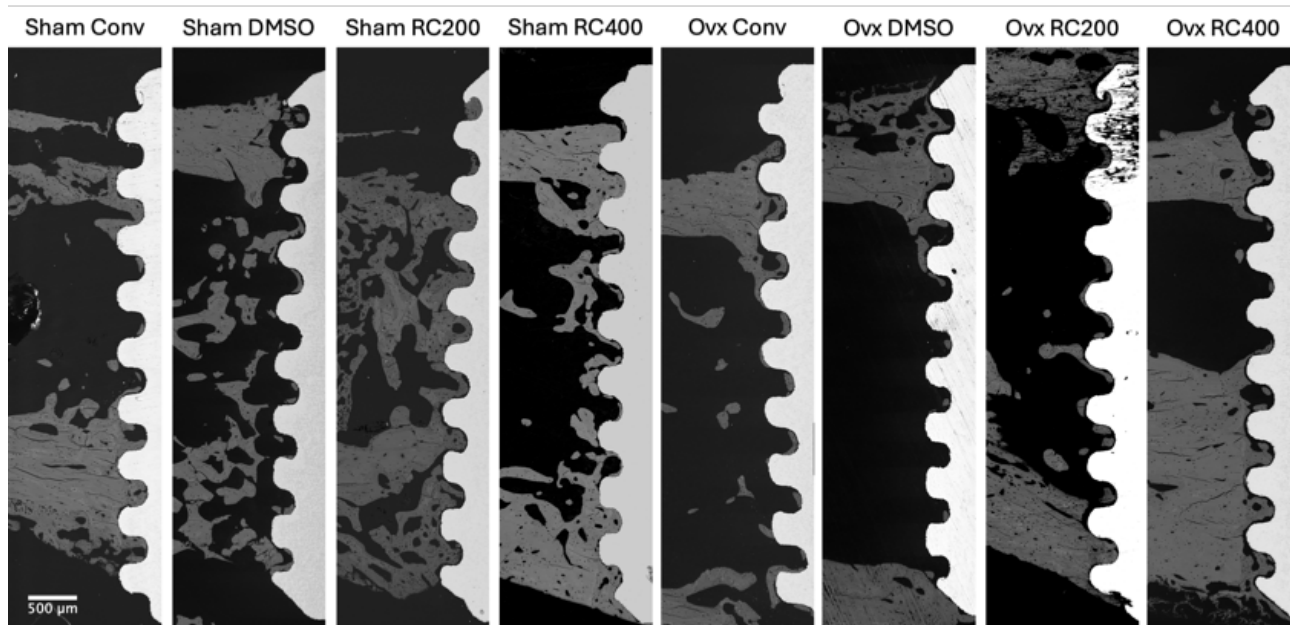
Figura 7- Imagem BSE-SEM da interface entre implante e osso. As setas pretas indicam áreas de fissuras na interface osso-implante.



Fonte: Autor, 2024.

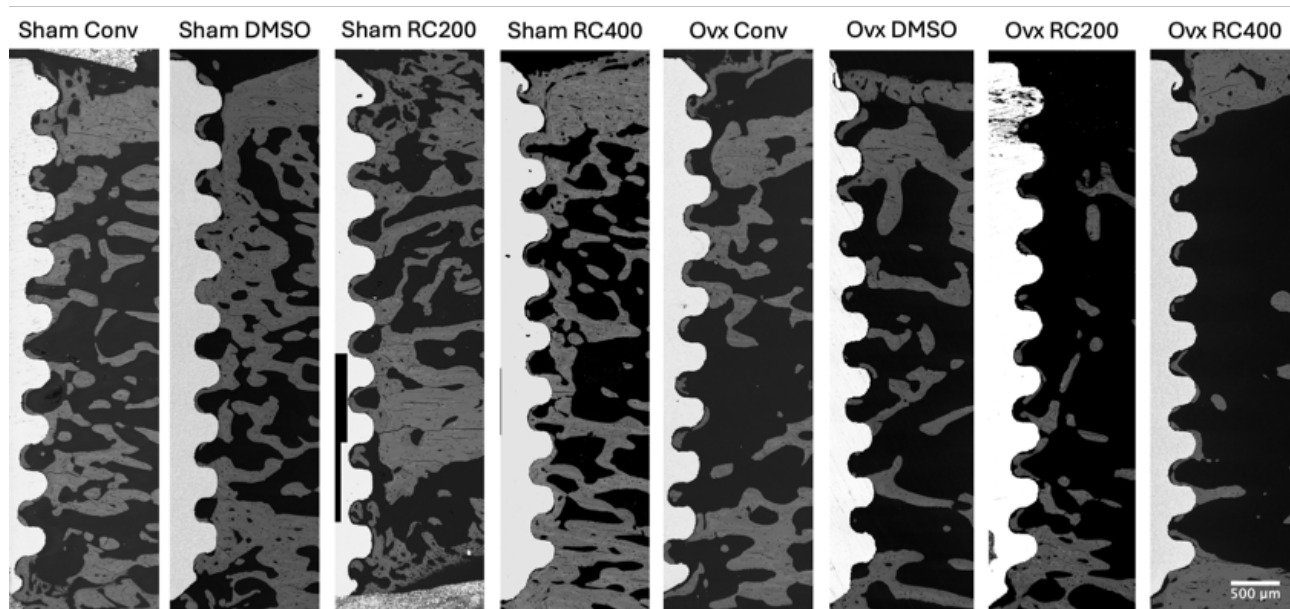
Após unir as imagens no software FIJI, é possível ter uma visão de menor ampliação da interface entre implante e osso (**Figura 8 e 9**).

Figura 8- Mosaico de imagens BSE-SEM para cada amostra com implante voltado para a metáfise distal da tíbia.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 9- Mosaico de imagens BSE-SEM para cada amostra com o implante voltado para a metáfise proximal da tíbia.

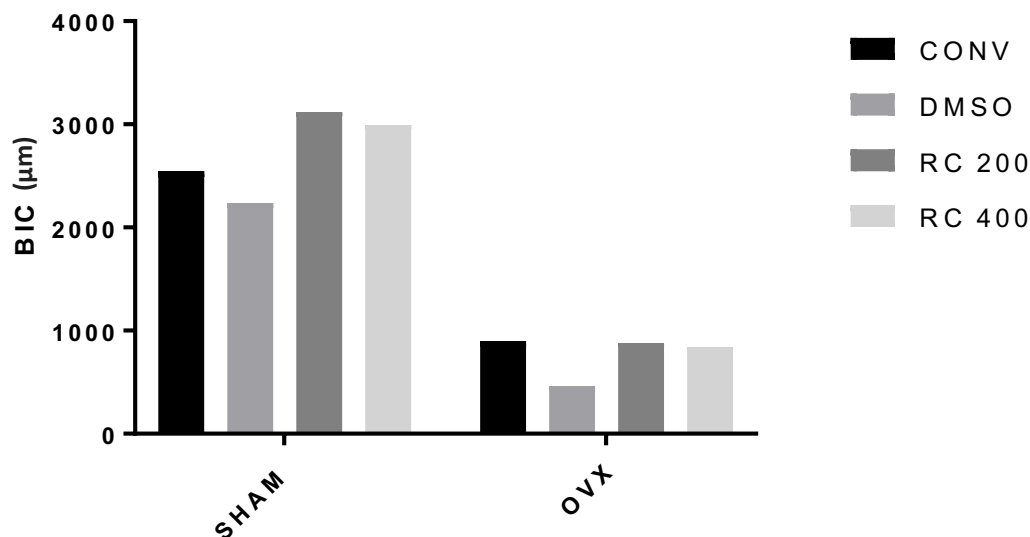


Fonte: Autor, 2024.

Aos 28 dias após a instalação dos implantes é possível observar nos animais ovariectomizados como a redução dos níveis circulantes de estrógeno teve um impacto negativo na formação óssea ao redor dos implantes.

4.5 BIC e BA

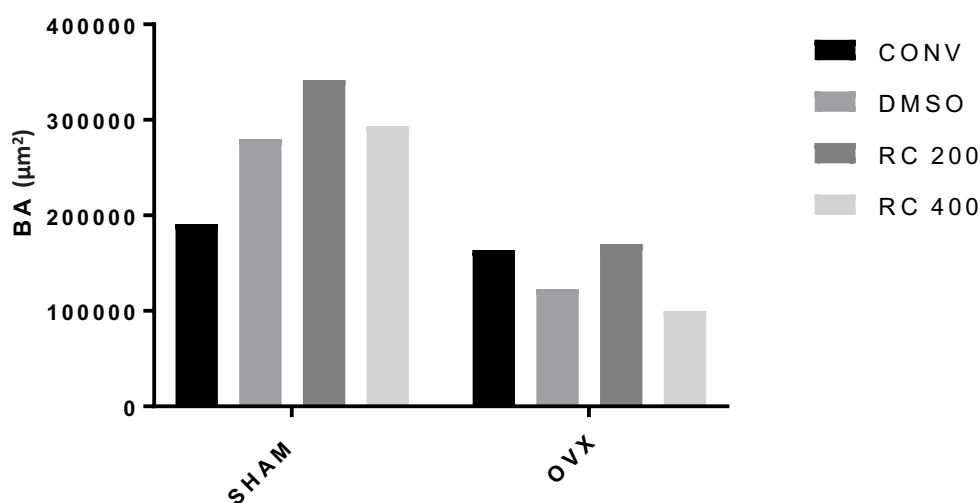
Gráfico 7- Resultados obtidos para o BIC (μm) através das imagens SEM-BSE dos oito grupos analisados.



Fonte: Autor, 2024.

Para o parâmetro BIC (**Gráfico 7**), nos animais SHAM, a superfície tratada com RC200 apresentou o maior valor ($3.179.195\mu\text{m}$), seguida por RC400 ($3.020.687\mu\text{m}$), CONV ($2.598.574\mu\text{m}$) e DMSO ($2.297.737\mu\text{m}$) consecutivamente. Para animais ovariectomizados, a superfície convencional obteve o maior valor ($907.016\mu\text{m}$), seguida de RC200 ($905.254\mu\text{m}$), RC400 ($887.821\mu\text{m}$) e DMSO ($481.128\mu\text{m}$) consecutivamente. Após 28 dias de reparação óssea ao redor dos implantes, o RC200 promoveu efeitos benéficos na osseointegração quando administrado preventivamente.

Gráfico 8- Resultados obtidos para BA (μm^2) através das imagens SEM-BSE dos oito grupos analisados.



Fonte: Autor, 2024.

Para o parâmetro BA (**Gráfico 8**), nos animais SHAM, o RC200 revelou possuir maior área óssea ($345.065,322\mu\text{m}^2$), seguido pelo RC400 ($298.852,788\mu\text{m}^2$), DMSO ($282.436,91\mu\text{m}^2$) e CONV ($193.701,467\mu\text{m}^2$). Para os animais ovariectomizados o RC200 também obteve o maior valor ($172.587,776\mu\text{m}^2$), seguido pelo CONV ($167.444,786\mu\text{m}^2$), DMSO ($128.461,917\mu\text{m}^2$) e RC400 ($102.127,935\mu\text{m}^2$) consecutivamente.

Tanto em animais SHAM quanto em OVX, a funcionalização com RC200 sugeriu melhorar a quantidade óssea ao redor das roscas do implante e, assim, colaborar com a osseointegração.

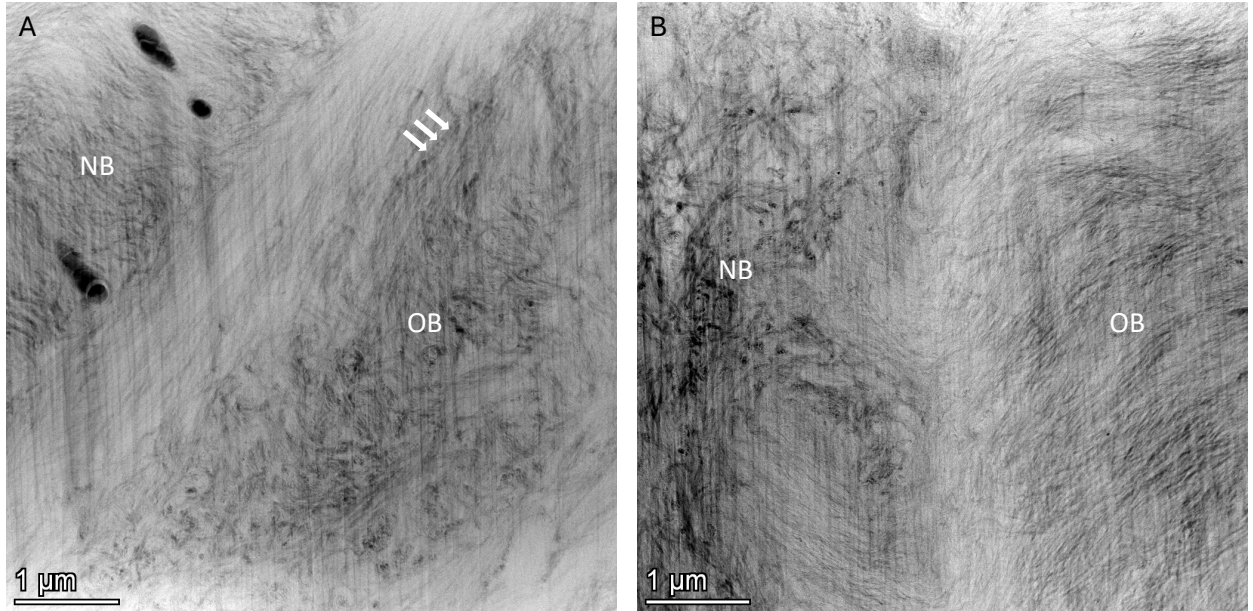
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

Com as imagens de Campo Escuro Anular de Alto Ângulo por Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (HAADF-STEM), é possível investigar o arranjo dos cristais de hidroxiapatita e fibras de colágeno em escala nanométrica e avaliar as diferenças entre a formação do padrão ósseo nas diferentes superfícies avaliadas (**Figura 10, 11, 12 e 13**).

As fibras colágenas são visíveis no STEM como interposição de zonas escuras e claras em sequência ao longo de toda a fibra, porém a visualização só é possível dependendo da direção em que a fibra colágena está disposta no corte³⁷. Quando as fibras de colágeno estão no plano da amostra, zonas claras e escuras

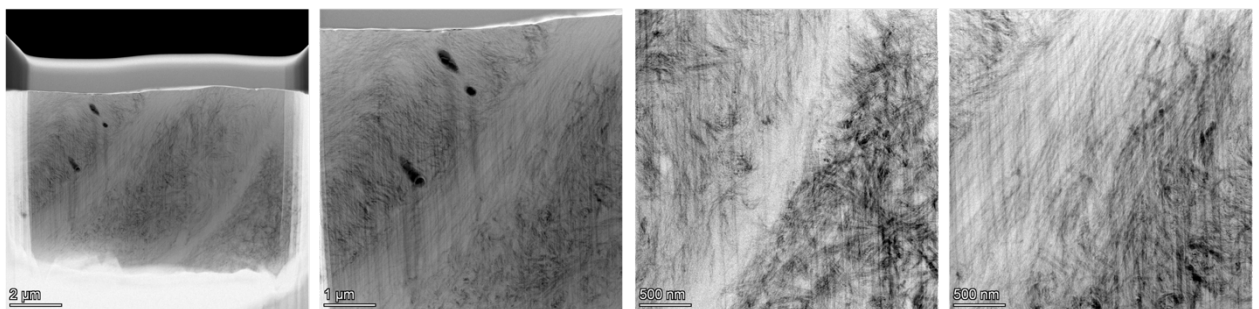
alternadas são visíveis, mas quando estão fora do plano da amostra, aparecem mais áreas de gap circulares³⁷.

Figura 10- Imagem HAADF-STEM da interface entre osso novo (NB) e osso antigo (OB). A) SHAM CONV. B) SHAM RC200. As setas brancas indicam uma fibra colágena.



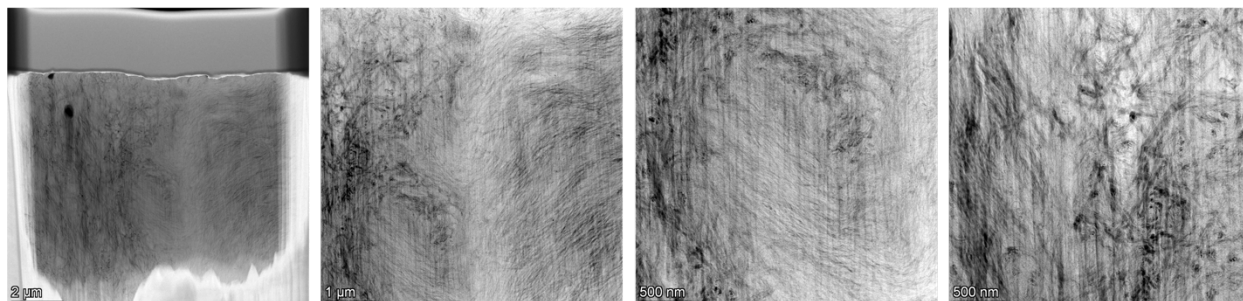
Fonte: Autor, 2024.

Figura 11- Imagens HAADF-STEM para o grupo SHAM CONV. Da esquerda para a direita: ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo, ampliação ainda maior da interface mostrando uma interface semelhante a uma linha de cimento altamente mineralizada, ampliação maior da interface mostrando fibras de colágeno alinhadas no limite e osso menos organizado em ambos os lados.



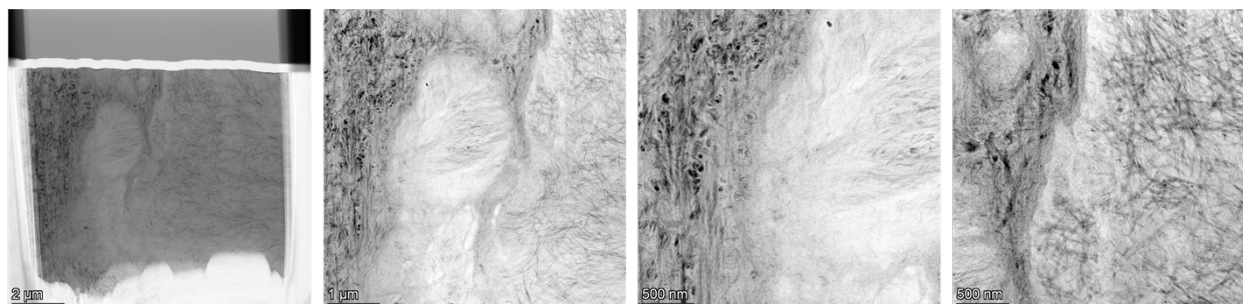
Fonte: Autor, 2024.

Figura 12- Imagens HAADF-STEM para o grupo SHAM RC200. Da esquerda para a direita: Ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo, ampliação ainda maior da interface mostrando fibras de colágeno organizadas no osso antigo, ampliação maior do osso novo com rápida formação de colágeno desorganizada.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 13- Imagens HAADF-STEM para o grupo OVX RC200. Da esquerda para a direita: Ampliação baixa, ampliação maior da interface entre osso antigo/novo.



Fonte: Autor, 2024.

Na **Figura 10**, no local do osso antigo, é possível verificar o padrão de fibras de colágeno conforme descrito por Grandfield *et al.*³⁸ e Schwarcz *et al.*³⁹. Em ambas as amostras é visível uma interface brilhante e altamente mineralizada com fibras de colágeno no plano da imagem. O novo osso formado (no lado esquerdo de ambas as imagens) mostra uma deposição rápida e uma estrutura tecidual desorganizada.

No grupo SHAM CONV (**Figura 11**) é possível observar o osso novo com alguns gaps, que foram defeitos produzidos durante a preparação da amostra pelo FIB, ou ainda canalículos de osteócitos que foram fresados pelo feixe de íons. O osso mais antigo parece mostrar que as fibras de colágeno são perpendiculares ao plano da imagem³⁸.

Para o grupo SHAM RC200 (**Figura 12**), observa-se o novo padrão ósseo, caracterizado por fibras de colágeno menos organizadas em comparação com o osso antigo. Este último exibe um padrão de fibras de colágeno altamente organizado na imagem. O padrão irregular das fibras indica que o novo osso ainda é um osso imaturo e foi rapidamente formado. A interface entre osso antigo/novo se mostra brilhante e,

portanto, altamente mineralizada, isso pode ser um indicativo da linha de cimento, ou ainda pode indicar que o tecido teve momentos de parada e início do processo de formação⁴⁰.

No grupo OVX RC200 (**Figura 13**) o novo padrão ósseo entrelaçado é evidente, apresentando fibras de colágeno menos organizadas. O osso lamelar no grupo OVX RC200 não é tão organizado como no grupo SHAM RC200.

5 DISCUSSÃO

O aumento da expectativa de vida está associado ao surgimento de um maior número de indivíduos com interferências sistêmicas, como a osteoporose. Quando presente, essa condição torna os casos de reabilitação oral por meio de implantes dentários mais desafiadores devido ao comprometimento do reparo ósseo periimplantar. Em termos acadêmicos, essa relação apresenta-se como um campo de estudo relevante, destacando a importância de considerar as condições sistêmicas na prática odontológica, especialmente em procedimentos como a instalação de implantes dentários¹⁻⁴. Para enfrentar esse desafio, são necessários estudos sobre tratamentos preventivos e terapêuticos que melhorem a qualidade do reparo tecidual periimplantar e evitem efeitos colaterais. A funcionalização de implantes de titânio com fármacos de ação local surge como uma opção inovadora, proporcionando a liberação controlada de moléculas bioativas, minimizando assim efeitos colaterais sistêmicos. O *Rubus coreanus* surge como uma alternativa promissora devido aos seus efeitos benéficos sobre o tecido ósseo. Estudos indicam que sua ação ocorre tanto na formação quanto na reabsorção óssea⁹⁻¹².

O objetivo deste estudo foi analisar o reparo ósseo periimplantar em ratas saudáveis ou ovariectomizadas, submetidas a instalação de implantes funcionalizados ou não com RC. Foi utilizada a técnica dip-coating, que consiste no processo de imersão dos implantes em uma solução com a finalidade de formar camadas ao redor dos implantes. A eutanásia foi realizada aos 28 dias após a instalação dos implantes nas metáfises proximais das tíbias dos animais. As amostras foram submetidas às análises de PCR para ALP, OCN e TRAP, Microtomografia-computadorizada para os parâmetros de BV, i.S e Conn.Dn, imunistoquímica para avaliação de OCN e TRAP no tecido periimplantar, além de análise ultraestrutural do tecido ósseo periimplantar através de microscopia eletrônica.

Através dos resultados obtidos pelo PCR para a expressão do gene para ALP, uma proteína relacionada com a precipitação de fosfato e uma melhora da qualidade dos cristais de hidroxiapatita, é possível observar que o grupo SHAM RC200 obteve uma alta expressão gênica, com diferença estatística quando comparado com os demais grupos, evidenciando o efeito benéfico do RC profilático. Nos animais SHAM, a expressão do gene para OCN, que também participa no processo de mineralização tecidual, é numericamente maior na superfície RC200,

seguida pelas superfícies RC400, CONV e DMSO, consecutivamente, com diferença estatística entre a superfície RC200 e DMSO, corroborando com a possibilidade de o RC200 melhorar a mineralização tecidual de forma profilática. Nas amostras OVX, a superfície CONV apresentou maior expressão de OCN quando comparado aos demais, com diferença estatística, mostrando assim o atraso na expressão gênica dessa proteína que faz parte da mineralização tecidual; e o grupo RC400 apresentou valores numericamente maiores quando comparado aos grupos DMSO e RC200, que foram numericamente semelhantes. Para TRAP, uma enzima responsável pela reabsorção óssea, nas amostras SHAM, a superfície RC400 apresentou maior expressão gênica, seguido pela RC200, DMSO e CONV, consecutivamente. Já nas amostras OVX, a superfície RC200 apresentou maior expressão gênica para TRAP, seguida pela RC400, CONV e DMSO, consecutivamente, resultado importante que evidencia a reabsorção óssea fisiológica responsável pela qualidade tecidual nos grupos tratados.

A análise de imunomarcação corroborou com os dados do PCR para RC200, evidenciando que a sinalização da expressão gênica para OCN estava chegando ao tecido e aumentando a atividade desta proteína não colágena que se relaciona com o processo de mineralização óssea. Vale destacar que a superfície RC200 mostrou-se com o melhor padrão reparacional, apresentando importante formação óssea com um grau de maturação tecidual superior às demais superfícies dentro deste grupo experimental. Para os grupos terapêuticos, a superfície RC200 também teve marcação intensa para OCN, portanto, pode-se evidenciar que o melhor padrão de resposta reparacional, quando avaliado pela proteína OCN, foi na superfície RC200. É possível avaliar também a expressão gênica relativa da TRAP, que participa no processo de reabsorção óssea através da atividade osteoclástica. Sob análise histológica, essa atividade foi mais pronunciada no grupo OVX RC200, evidenciando osteoclastos em atividade no tecido ósseo neoformado na região das espiras dos implantes. A reabsorção óssea nessa superfície confirmou a melhor qualidade do tecido ósseo, associada a uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado, indicando um maior grau de maturidade do osso reparacional nessa região.

Com a análise microtomográfica foi possível avaliar a microarquitetura do tecido ósseo periimplantar. Pelas respostas macroscópicas provenientes desta análise, a funcionalização da superfície dos implantes com RC não foi capaz de proporcionar melhorias morfológicas com diferença estatística significativa. É

possível que a macroestrutura óssea esteja em processo de mineralização e não tenha atingido maiores resultados nesse momento; uma análise microtomográfica com amostras que tenham tido um tempo maior que 28 dias de inserção do implante, seria capaz de avaliar se a estrutura macroscópica teria um desenvolvimento superior.

O osso é um tecido nanoestruturado que possui compostos orgânicos e inorgânicos, sendo principalmente colágeno e hidroxiapatita respectivamente⁴¹. Essas estruturas nanométricas foram analisadas através de um Microscópio Eletrônico de Transmissão. Com essa análise, foi possível avaliar o tecido ósseo formado próximo as espiras do implante, que apresenta um padrão menos organizado de fibras de colágeno e cristais de hidroxiapatita, o que indica a rápida formação óssea iniciada após a instalação do implante. Por outro lado, no osso antigo, podemos observar um padrão organizado com fibras de colágeno bem orientadas (no plano ou fora do plano da imagem) e cristais de hidroxiapatita. No entanto, é importante notar que a orientação das fibras de colágeno é influenciada pela orientação da amostra para geração de imagens. Os resultados qualitativos obtidos mostraram que a funcionalização dos implantes com RC promoveu melhor contato osso-implante e área óssea quando administrado preventivamente. As imagens obtidas por TEM revelam a organização ultraestrutural da morfologia óssea e podem inferir que a funcionalização com RC promove uma formação óssea sem reações adversas, podendo levar a um processo saudável de osseointegração.

6 CONCLUSÃO

A avaliação conjunta dos resultados indica que a funcionalização dos implantes com RC, em especial o RC200, promove importantes respostas benéficas no processo de reparo periimplantar, principalmente quando administrado de forma preventiva.

REFERÊNCIAS

1. Fu SW, Zeng GF, Zong SH, Zhang ZY, Zou B, Fang Y, Lu L, Xiao DQ. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutr Res.* 2014 Jun;34(6):467-77. doi:10.1016/j.nutres.2014.05.003. Epub 2014 May 17. Review. PubMed PMID: 25026913.
2. Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, Figueiredo LC, Cassoni A, Shibli JA. Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. *World J Orthop.* 2015 Mar 18;6(2):311-5. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.311.eCollection 2015 Mar 18. PubMed PMID: 25793172; PubMed Central PMCID: PMC4363814.
3. Anil S, Preethanath RS, AlMoharib HS, Kamath KP, Anand PS. Impact of osteoporosis and its treatment on oral health. *Am J Med Sci.* 2013 Nov;346(5):396-401. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31828983da. Review. PubMed PMID:23588259.
4. Bozic M, Ihan Hren N. Osteoporosis and mandibles. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006 May;35(3):178-84. PubMed PMID: 16618852.
5. Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocr Rev.* 2008 Jun;29(4):441-64. doi: 10.1210/er.2008-0002. Epub 2008 May 1. Review. PubMed PMID: 18451258; PubMed Central PMCID: PMC2528848.
6. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Feb;6(2):99-105. doi: 10.1038/nrrheum.2009.260. Review. Erratum in: *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Apr;6(4):184. PubMed PMID: 20125177.
7. Giusti A, Bianchi G. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clinical interventions in aging.* 2015;10:105.
8. Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging.* 2015 Mar 20;10:583-91. doi: 10.2147/CIA.S54614. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 25848234; PubMed Central PMCID: PMC4374649.
9. Lee KH, Choi EM. *Rubus coreanus* Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. *Am J Chin Med.* 2006;34(4):643-54. PubMed PMID: 16883635.
10. Kaume L, Howard LR, Devareddy L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem.* 2012 Jun 13;60(23):5716-27. doi: 10.1021/jf203318p. Epub 2011 Dec 8. Review. PubMed PMID: 22082199.

11. Do SH, Lee JW, Jeong WI, Chung JY, Park SJ, Hong IH, Jeon SK, Lee IS, Jeong KS. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause*. 2008 Jul-Aug;15(4 Pt 1):676-83. PubMed PMID: 18709701
12. Valencia-Llano, C. H., Solano, M. A., & Grande-Tovar, C. D. (2021). Nanocomposites of Chitosan/Graphene Oxide/Titanium Dioxide Nanoparticles/Blackberry Waste Extract as Potential Bone Substitutes. *Polymers*, 13(22), 3877. <https://doi.org/10.3390/polym13223877>
13. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater*. 2018 Jan;34(1):40-57. doi: 10.1016/j.dental.2017.09.007. Epub 2017 Oct 10. Review. PubMed PMID: 29029850.
14. Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, de Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008 Mar;28(2):205-11.
15. Andrade PD, Vasconcellos LM, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELS, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: in vitro study. *Mat Sci and Eng C*. 2015;56:538-44.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–275.
17. do Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VA, Carvalho YR, Cairo CA, de Vasconcellos LM. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Nov;26(11):259.
18. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt*. 2015 Mar;20(3):038003. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.038003.
19. Lee KH, Choi EM. *Rubus coreanus* Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. *Am J Chin Med*. 2006;34(4):643-54. PubMed PMID: 16883635.
20. Lee, H., & Park, J. B. (2019). Dimethyl Sulfoxide Leads to Decreased Osteogenic Differentiation of Stem Cells Derived from Gingiva via Runx2 and Collagen I Expression. *European journal of dentistry*, 13(2), 131–136. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1694904>
21. Lemieux, J. M., Wu, G., Morgan, J. A., & Kacena, M. A. (2011). DMSO regulates osteoclast development in vitro. *In vitro cellular & developmental biology*. *Animal*, 47(3), 260–267. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9385-8>

22. Yang, C., Madhu, V., Thomas, C., Yang, X., Du, X., Dighe, A. S., & Cui, Q. (2015). Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cell and tissue research*, 362(3), 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2245-1>
23. Parent, M., Nouvel, C., Koerber, M., Sapin, A., Maincent, P., & Boudier, A. (2013). PLGA in situ implants formed by phase inversion: critical physicochemical parameters to modulate drug release. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 172(1), 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.024>
24. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., Pearl, E. J., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *BMJ open science*, 4(1), e100115. <https://doi.org/10.1136/bmjos-2020-100115>.
25. Gomes-Ferreira, P. H. S., de Oliveira, D., Frigério, P. B., de Souza Batista, F. R., Grandfield, K., & Okamoto, R. (2020). Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchietomized rats. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 31(9), 1807–1815. <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05431-y>
26. LONG J.A.; EVANS H.M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer. Calif.*, v. 6, p. 1-148, 1922.
27. Quirino LC, de Azambuja Carvalho PH, Neto RTA, Comachio CA, Monteiro NG, Ervolino-Silva AC, Okamoto R, Pereira-Filho VA. Polydioxanone Membrane Compared with Collagen Membrane for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)*. 2023 Feb 9;15(4):868. doi: 10.3390/polym15040868. PMID: 36850154; PMCID: PMC9963858.
28. BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research*, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
29. dos Santos, P. L., Queiroz, T. P., Margonar, R., Gomes de Souza Carvalho, A. C., Okamoto, R., de Souza Faloni, A. P., & Garcia, I. R., Jr (2013). Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability?. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 71(3), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2012.10.017>
30. Luvizuto, E. R., Dias, S. M., Queiroz, T. P., Okamoto, T., Garcia, I. R., Jr, Okamoto, R., & Dornelles, R. C. (2010). Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or

- raloxifene. *Bone*, 46(4), 1021–1029.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.12.016>
31. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 28(1):2-17.
 32. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 33. Faverani, L. P., Polo, T. O. B., Ramalho-Ferreira, G., Momesso, G. A. C., Hassumi, J. S., Rossi, A. C., Freire, A. R., Prado, F. B., Luvizuto, E. R., Gruber, R., & Okamoto, R. (2018). Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clinical oral investigations*, 22(1), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2106-2>
 34. Gomes, F. V., Mayer, L., Massotti, F. P., Baraldi, C. E., Ponzoni, D., Webber, J. B., & de Oliveira, M. G. (2015). Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 44(2), 245–251.
<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.09.010>
 35. Jarmar, T.; Palmquist, A.; Brañemark, R.; Hermansson, L.; Engqvist, H.; Thomsen, P. Technique for preparation and characterization in cross-section of oral titanium implant surfaces using focused ion beam and transmission electron microscopy. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2008, 87A, 1003–1009.
 36. Thorfve A, Palmquist A, Grandfield, K. Three-dimensional analytical techniques for evaluation of osseointegrated titanium implants. *Materials Science and Technology*. 2015;31(2):174-9.
 37. Shah FA, Johansson BR, Thomsen P, Palmquist A. Ultrastructural evaluation of shrinkage artefacts induced by fixatives and embedding resins on osteocyte processes and pericellular space dimensions: Ultrastructural Evaluation of Shrinkage Artefacts. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(4):1565–76.
 38. GRANDFIELD, Kathryn; VUONG, Vicky; SCHWARCZ, Henry P. Ultrastructure of bone: hierarchical features from nanometer to micrometer scale revealed in focused ion beam sections in the TEM. *Calcified tissue international*, v. 103, p. 606-616, 2018.
 39. Schwarcz H. P. (2015). The ultrastructure of bone as revealed in electron microscopy of ion-milled sections. *Seminars in cell & developmental biology*, 46, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.06.008>

40. Okada, H., Tamamura, R., Kanno, T., Nakada, H., Yasuoka, S., Arikawa, K., ... & Davies, J. E. (2013). Ultrastructure of cement lines. *Journal of Hard Tissue Biology*, 22(4), 445-450.
41. Mangano, F., Raspanti, M., Maghaireh, H., & Mangano, C. (2017). Scanning Electron Microscope (SEM) Evaluation of the Interface between a Nanostructured Calcium-Incorporated Dental Implant Surface and the Human Bone. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1438.
<https://doi.org/10.3390/ma10121438>

ANEXO A – Comitê de Ética



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 Relatório Final do trabalho intitulado "**Avaliação das respostas de biomineralização pelo *Rubus coreanus* frente a deficiência de estrógeno. Um estudo translacional**", Processo FOA nº 2020-410, sob responsabilidade de Roberta Okamoto e colaboração de Paulo Noronha Lisboa Filho e Luana Marotta Reis de Vasconcelos foi aprovado pela CEUA em 23 de Abril de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of biomineralization responses by *Rubus coreanus* in estrogen deficiency. A translational study**", Process FOA nº 2020-410, under the supervision of Roberta Okamoto and collaboration of Paulo Noronha Lisboa Filho and Luana Marotta Reis de Vasconcelos had its the Final Report approved by the CEUA on April 23, 2024.

Prof. Assoc. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator