



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**Análise do reparo ósseo da superfície de implante
revestida com raloxifeno através das análises topográfica,
biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica**



Araçatuba
2020

NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**Análise do reparo ósseo da superfície de implante
revestida com raloxifeno através das análises topográfica,
biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Profº Associado Idelmo Rangel
Garcia Junior

Araçatuba
2020

Dedico este trabalho aos meus pais Janáina de Sousa Santos Sanches e Edson Roberto Sanches, por serem a tradução de amor incondicional. Agradeço, não só por eles estarem na batalha comigo, mas, por eles quererem estar nela ao meu lado. O porto seguro de um abraço ou de poucas palavras de motivação são seus super poderes. Obrigada por me ensinarem, que mesmo com as nossas imperfeições mundanas, sempre devemos buscar ser bons, respeitosos e acima de tudo dedicados. Por isso digo, minhas vitórias sempre serão as deles. Eu os amo muito e sempre os levarei comigo.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais Janaina de Sousa Santos Sanches e Edson Roberto Sanches, que sempre estiveram ao meu lado, me auxiliando para que eu possa ser independente, disciplinada e educada. Cada decisão que é tomada requer sacrifícios, mas o suporte por vocês dado, me incentiva a sempre pensar positivo e grande. Obrigada por confiarem em mim e mesmo distante sempre mostrarem-se presentes e dispostos a tudo por mim e por nossa família. Vocês são o meu maior exemplo e quero honrá-los sempre. Eu amo vocês!

A minha avó Terezinha de Sousa Santos, por todo zelo com a nossa família, uma mulher que me enche de orgulho por ser batalhadora e mostrar que com fé em Deus temos o poder de vencer todas as dificuldades que o mundo nos traz. Obrigada por ser a mulher de doces palavras que enche o meu coração de saudade quando eu ligo. Eu te amo vovó!

Ao meu namorado Felipe Megumi Nakama, que mesmo com a distância sempre se mostrou presente, pois nossos planos sempre foram concretos. Obrigada por me fortalecer em momentos difíceis, por abrir meus olhos quando estou enlouquecendo com os meus afazeres e por sempre comemorar minhas pequenas vitórias. Você aceitou sacrificar muitas coisas pelo nosso relacionamento, mas com uma certeza, que todos os sacrifícios são passageiros e que são em prol do nosso futuro. Eu te amo!

A doutoranda Lara Cristiana Cunha Cervantes, uma pessoa mais do que admirável, obrigada por todos os conselhos, ajuda e paciência. Trabalhar ao seu lado sempre será uma honra. Dedico todos os meus ganhos acadêmicos a você, pois graças a você eu me permiti ir muito além. Sem contar que te vejo como amiga, não tenho medo de conversar com você sobre os meus sonhos. Obrigada por sempre estar de braços abertos, que Deus sempre guie o seu caminho, estarei torcendo por cada etapa da sua vida. Não tenho dúvida que você conseguirá tudo que sonha. Te amo!

A minha amiga Alana Semenzin Rodrigues, que com toda a calma e fé me mostrou que o mundo pode, sim, mudar. Todos os dias são abençoados e temos que dar valor a cada detalhe que passa por nossas mãos. Obrigada por cada abraço e risada, você é uma pessoa muito especial em minha vida e vou levá-la para sempre em meu coração. Não tenho dúvida do seu sucesso. Eu te amo muito, sempre estarei torcendo por ti e vibrando a cada vitória.

A minha amiga Alessandra Froes de Oliveira, que além de ser atleta ouro que marcou história no Inters Unesp, é o vocal mais afinado que a surubateria já teve. Só tenho a agradecer por você estar ao meu lado me aconselhando e torcendo por mim, acho plausível dizer que você sabe lidar com o meu jeito teimoso de ser. Bom, só sei que você me mudou de certa forma e sou muito grata por isso. Sua amizade é muito importante para mim e saiba que sempre estarei aqui para você. Tenho certeza que o seu futuro será repleto de aventuras, aproveite todas as oportunidades de viver algo novo sem medo de ser feliz, não tenho dúvidas de sua capacidade profissional, você será excepcional. Te aplaudo de pé. Eu te amo muito!

A minha amiga Vitória Zinza Custódio, um pequeno terremoto que abalou a minha vida da melhor forma possível, ao longo desses anos nos conectamos de uma forma única, sempre estarei aqui para o que der e vier. Obrigada por sempre me ouvir e me ajudar a não esquecer que “só se vive uma vez”, minha eterna companheira de loucuras. Sua amizade é muito importante para mim e sei que ainda teremos história para contar, seja dividindo um vinho em um fim de tarde ou até esquecendo todos os problemas em uma festa. Amiga o seu sucesso é garantido, como profissional tenho certeza que terá um futuro maravilhoso, espero poder te acompanhar por mais estes dois anos, afinal “não te largou, não te esqueço”. Estarei sempre na plateia torcendo por você. Te amo muito!

A minha sogra Ana Satie Yashiro Nakama por todo apoio, carinho e conselhos. Obrigada por sempre acreditar que posso mais. Te conhecer foi maravilhoso, pois vi em você, uma amiga, posso conversar sem medo sobre meus sonhos e minhas dificuldades, pois sei que você sempre estará de braços abertos. Te amo muito!

A minha amiga Carolina Arcari Pintão, que compartilhamos uma amizade de mais de 14 anos, eu desafio qualquer pessoa de tentar nos separar, a cada ano que passa vejo o quanto nossa amizade se fortalece. Sempre conversamos sobre o futuro, aqueles sonhos hipoteticamente grandiosos foram tomando novas caras. Nos adaptamos a um novo tempo e espaço, você sempre apoiou os meus sonhos e comemorou cada passo comigo. Obrigada por ser “a minha pessoa”, que mesmo com a distância a nossa amizade é “velha de guerra”, aguenta qualquer coisa. Te amo!

Aos Pós Graduandos e Professores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

Ao meu orientador Prof^o Associado Idelmo Rangel Garcia Júnior, por todo ensinamento, aperfeiçoamento e credibilidade. Todo o conhecimento adquirido e projetos concluídos foram um incentivo para eu querer dar continuidade aos estudos, sempre buscando independência e didática. Agradeço de coração por todas as oportunidades ao longo do período de graduação. Foi uma grande honra trabalhar ao seu lado e representar a nossa universidade em seu nome.

Ao Prof^o Assistente Leonardo Perez Faverani e a Prof^a Associada Roberta Okamoto, que são pessoas encantadoras que sempre se mostram dispostos a dar o melhor para nos tornar melhores. Obrigada por todo sorriso de encorajamento e por me mostrar que inteligência e bom humor podem ser melhores amigos.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao ex-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof^o Titular Wilson Roberto Poi, por todas as conversas de encorajamento. Obrigada por sempre manter a fé, em nós alunos. Sei que o futuro nos reserva grandes coisas para todos nós. E ao atual diretor Prof^o Titular Glauco Issamu Miyahara e ao Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem por sempre se mostrarem presentes aos alunos, incentivando a sempre buscar mais.

A bateria universitária, surubateria, por ser um porto seguro, um ponto de encontro de amigos que levo comigo sempre, espero que ela continue crescendo e tocando o samba mais lindo que já ouvi.

Ao assistente de Suporte Acadêmico Marco Aurélio de Oliveira Ianner, pelo apoio técnico que forneceu durante o período do desenvolvimento das etapas laboratoriais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica Processo 2018/13264-0, os quais foram fundamentais para a realização desta pesquisa,

“Um trabalho bem feito é realizado, não com força bruta, mas, com respeito, dedicação e perseverança. Por isso, respeite o seu colega, se dedique ao máximo no trabalho e com certeza vencerá.”

Elísio Magalhães

SANCHES, N. S. **Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica.** 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O sucesso clínico de implantes dentários está relacionado com a osseointegração precoce. A geometria e a superfície são cruciais para o sucesso dos implantes a curto e longo prazo. Devido ao progresso que se tem feito, esses materiais estão disponíveis em diferentes opções no mercado. No entanto, ainda há necessidade de melhorar a tecnologia desses materiais visando a regeneração óssea precoce. O objetivo deste trabalho foi avaliar as superfícies de implantes de titânio comercialmente puro tratadas através do duplo ataque ácido referente ao grupo controle e com a deposição raloxifeno pelo método biomimético, com o objetivo de avaliar a interface osso/implante em modelo padronizado em tibia de rato. Com este propósito, foram utilizados 144 implantes de titânio comercialmente puro de 1,6 de diâmetro e 3,0 mm de altura, sendo 72 referentes ao grupo controle e 72 referentes ao grupo raloxifeno que foram instalados nas tíbias de ratos. Os períodos de eutanásia para a coleta das tíbias foram 7, 15, 30 e 40. Os espécimes foram submetidos à análise biomecânica, topográfica, histométrica e imunoistoquímica. Os dados quantitativos foram avaliados adotando o nível de significância $p < 0,05$. A análise biomecânica por torque-reverso em Newton centímetro revelou resultado semelhante entre os grupos controle e raloxifeno ($p = 0,03$). A análise histológica revelou que aos 7 dias o comportamento da superfície modificada por raloxifeno possui maior quantidade de tecido conjuntivo em comparação com as lâminas controle. Nos demais períodos o comportamento de modelação óssea foi semelhante, dando destaque para o grupo controle nos valores de área óssea. A análise de imunoistoquímica revelou diferença entre os grupos no período de 15 dias, visto que o grupo raloxifeno apresentou rápida ativação proteica em relação ao grupo controle, como é possível observar na imunomarcagem da Osteocalcina, Osteoprogesterina e Colágeno-1, porém aos 40 dias o grupo raloxifeno indicou ter imunomarcagem leve nos grupos da Osteocalcina, Osteoprogesterina, ligante do receptor ativador nuclear kappa B e de

leve a moderado no Colágeno-1, revelando ter menor quantidade de matriz óssea mineralizada e menor área óssea neoformada em relação ao grupo controle. Na análise histomorfométrica foi possível analisar que houve diferença estatística entre os grupos controle e raloxifeno durante os períodos de 7 ($p=0,005$) e 40 dias ($p=0,04$) e na análise de extensão linear de contato entre tecido ósseo e superfície do implante foi possível observar diferença estatisticamente significativa no grupo raloxifeno, entre os períodos de 15 e 7 dias, com $p=0,03$. Além disso, na comparação entre os dois grupos, observou-se diferença estatística durante o período de 7 dias, com $p<0,001$ em que o grupo controle apresentou resultados superiores. Portanto, os resultados qualitativos e quantitativos dos grupos estudados não apresentaram grande discrepância entre si, indicando um comportamento análogo a longo prazo. Sabendo o comportamento deste fármaco em indivíduos normofisiológicos, é encorajado o estudo atribuindo maiores concentrações deste para análises futuras sobre alterações de neoformação óssea.

Palavras-chave: Implantação dentária. Raloxifeno. Titânio.

SANCHES, N. S. **Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica** 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The clinical success of dental implants is related to early osseointegration. Geometry and surface are crucial to implant success in the short and long term. Due to the progress that has been made, these materials are available in different options on the market. The objective of this study was to evaluate the surfaces of commercially pure titanium implants treated through the double acid attack related to the control group and with the deposition raloxifene by the biomimetic method related to the raloxifene group and to evaluate the interface bone/implant in standard mouse tibia model. For this purpose, 144 commercially pure titanium implants of 1.6 diameters and 3.0 mm height were utilized, 72 of which were related to the control group and 72 related to the raloxifene group that will be installed in the rat tibias. The periods of euthanasia for the collection of the tibias were 7, 15, 30 and 40. The specimens were submitted to biomechanical, topographic, histometric and immunohistochemical analysis. The quantitative data were evaluated by adopting the level of significance $p < 0.05$. Biomechanical analysis by reverse torque in Newton centimeter showed that there wasn't a statistical difference between the control groups and raloxifene ($p = 0.03$). Histological analysis revealed that at 7 days the behavior of the surface-modified by raloxifene has a higher amount of connective tissue compared to the control blades. In other periods, bone modeling behavior was similar, highlighting the control group in bone area values. The immunohistochemical analysis showed a difference between the groups in the 15 days, since the raloxifene group presented rapid protein activation about the control group, as can be observed in the immunomarking of Osteocalcin, Osteoprogesterin, and Collagen-1, but at 40 days the raloxifene group indicated mild immunolabeling in the Osteocalcin, Osteoprogesterin, kappa B nuclear activator receptor ligand and mild to moderate Collagen-1, revealing a lower quantity of mineralized bone matrix and a lower neoformed bone area about the control group. In the histomorphometric analysis, it was possible to analyze that there was a statistical

difference between the control groups and raloxifene during the periods of 7 ($p=0.005$) and 40 days ($p=0.04$) and in the analysis of the linear extension of contact between bone tissue and implant surface, it was possible to observe a statistically significant difference in the raloxifene group, between the periods of 15 and 7 days, with $p=0.03$. Additionally, in the comparison between the two groups, a statistical difference was observed during the 7 days, with $p<0,001$, in which the control group presented superior results. Therefore, the qualitative and quantitative results of the studied groups did not present a great discrepancy between them, indicating similar long-term behavior. Knowing the behavior of this drug, in normofisiological individuals, the study is encouraged by assigning higher concentrations of this drug to future analyses of bone neoformation changes.

Keywords: Dental Implantation. Raloxifene. Titanium.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Delineamento Experimental.....	23
FIGURA 2 - 1ª Fase de modificação por ácido do GCRT e do GRLX.....	24
FIGURA 3 - Implantes imersos na solução de NaOH	25
FIGURA 4 - Preparação do Simulador de Fluido Corpóreo	25
FIGURA 5 - Implantes imersos na solução de SFC com raloxifeno 1mg/ml	25
FIGURA 6 - Procedimento cirúrgico para a instalação dos implantes.....	27
FIGURA 7 - Sequência de remoção do implante da peça incluída em parafina.....	31
FIGURA 8 - Sequência da seleção da área de interesse do implante por meio do uso do programa ImageJ	33
FIGURA 9 - MEV do GCRT e do GRLX	35
FIGURA 10 - EDR dos GCRT (A) e GRLX (B).....	36
FIGURA 11 - Histológico do período 7 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	37
FIGURA 12 - Histológico do período 15 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	38
FIGURA 13 - Histológico do período 30 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	39
FIGURA 14 - Histológico do período 40 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	39
FIGURA 15 - Histológico do período 7 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	40

FIGURA 16 - Histológico do período 15 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	41
FIGURA 17 - Histológico do período 30 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	41
Figura 18 - Histológico do período 40 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.....	42
FIGURA 19 - Lâminas marcadas pela proteína COL-I nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX.....	43
FIGURA 20 - Lâminas marcadas pela proteína RANK-L nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX.....	44
FIGURA 21 - Lâminas marcadas pela proteína OPG nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias dos GCTR e GRLX.....	45
FIGURA 22 - Lâminas marcadas pela proteína OC nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Torque Reverso do GCRT e do GRLX aos 40 dias de eutanásia.....	36
GRÁFICO 2 - Valores AON do GCRT e do GRLX	48
GRÁFICO 3 - Valores ELCOI do GCRT e do GRLX	49

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Análise comparativa da AON em percentagem.....	49
TABELA 2 - Análise comparativa do ELCOI em percentagem.....	50

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1 - Escores e frequência de porcentagem para análise de imunoistoquímica.....	34
QUADRO 2 - Análise estatística da análise de torque-reverso para os GCRT e GRLX aos 40 dias de eutanásia.....	37
QUADRO 3 - Escores da análise de imunoistoquímica nos períodos de 15,30 e 40 dias do GCRT e do GRLX.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Porcentagem

°C = Graus célsius

µm = Micrometros (unidade de medida)

ANOVA = Análise de variância

AO = Área de tecido ósseo

AON = Área de óssea neoformada

C = Carbono

Ca = Cálcio

Cl = Cloro (unidade de medida)

Cm = Centímetros (unidade de medida)

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COL-1 = Colágeno

EDS = Energia dispersiva

EDTA = Etilenodiaminotetracético

ELCOI = Extensão linear de contato entre tecido ósseo de superfície do implante

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

GCRT = Grupo Controle

GRLX = Grupo Raloxifeno

HE = Hematoxilina e Eosina

JPEG = Joint Photographics Experts Group

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

Mg/Kg = Miligrama por quilo (unidade de medida)

Mg/Kg/dia = Miligrama por quilo (unidade de medida) por dia

Mg/ml = Miligrama por mililitro (unidade de medida)

ml = Mililitro (unidade de medida)

ml/Kg = Mililitro por quilo (unidade de medida)

mm = Milímetro (unidade de medida)

mol.L = Mol litro (unidade de medida)

MSRE = Modulador seletivo de receptor estrogênico

N.cm = Newton centímetro (unidade de medida)

N = Nitrogênio

Na = Sódio

NaOH = Hidróxido de Sódio

O = Oxigênio

OC = Osteocalcina

OPG = Osteoprogesterina

P = Fósforo

P = Nível crítico da estatística (p 0,05)

Ph = Potencial hidrogeniônico

PVP-I = Povidona-iodo

RANK-L = Ligante do receptor ativador nuclear kappa B

Rpm = Rotação por minuto

S = Enxofre

SFC = Solução de fluido corpóreo

Ticp = Titânio puro comercialmente

UNESP = Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVO	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Delineamento Experimental	23
3.2	Preparação das Superfícies Teste e Controle	24
3.3	Procedimento Cirúrgico	27
4	EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL	29
5	ANÁLISE	30
5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de energia Dispersiva De Raio X	30
5.2	Análise Biomecânica (Torque-Reverso)	30
5.3	Análise Histológica	30
5.3.1	Processamento para Inclusão em Parafina	30
5.4	Análise Histométrica	32
5.5	Análise Imunoistoquímica	33
5.6	Análise Estatística	34
6	RESULTADOS	35
6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de energia Dispersiva de Raio X	35
6.2	Análise Biomecânica (Torque-Reverso)	36
6.3	Análise Histológica	37
6.3.1	Grupo controle	37
6.3.2	Grupo raloxifeno	40
6.4	Analise Imunoistoquimica	42
6.4.1	Colágeno	42

6.4.2 Ligante do receptor ativador nuclear kappa-b	44
6.4.3 Osteoprogesterina	45
6.4.4 Osteocalcina	46
6.5 Análise Estatística	48
7 DISCUSSÃO	51
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	59

1 INTRODUÇÃO

Com o progresso que se tem feito com o desenvolvimento dos implantes dentários, estes encontram-se disponíveis no mercado em diferentes opções, de acordo com a geometria, tipo e características de superfície (MAZZO et al., 2012). No entanto, ainda há a necessidade de melhorar as tecnologias desses materiais, especialmente aquelas relacionadas à regeneração óssea (YOUNIS et al., 2010). Uma área atual de pesquisa envolve o tratamento da superfície de implantes para estimulação da osseointegração devido a alteração química ou micromorfológica do implante (LE GUÈHENNEC et al., 2007).

Estudos apontam que o raloxifeno tem maior relevância clínica para a melhora da resposta da dinâmica óssea, principalmente em ratas com osteoporose induzida (FAVERANI et al., 2018), beneficiando também, pacientes com capacidade de cicatrização óssea reduzida, que sofrem de osteoporose e que são expostos a medicamentos imunossupressores ou aqueles que foram submetidos a irradiação no combate ao câncer (HARMANKAYA et al., 2013).

O modulador seletivo do receptor estrogênio (MSRE) inibe a reabsorção óssea a curto e a longo prazo, melhorando assim a fixação do implante, levando a um aumento da massa e força óssea (REY et al., 2009). O único MSRE aprovado para o tratamento da osteoporose é o raloxifeno (ERIKSEN, 2006).

O raloxifeno é um MSRE de segunda geração que está disponível a quase uma década para o tratamento e prevenção de osteoporose em mulheres na menopausa (DELMAS et al., 2002; MOEN; KEATING, 2008). Este medicamento compete com o estrógeno a nível de receptor, agindo como agonista do estrógeno no tecido ósseo e como antagonista no útero e nos tecidos mamários (CLEMETT; SPENCER, 2012; HOCHNER-CELNIKIER, 1999). Os MSRE melhoram a função e diferenciação dos osteoblastos e aumentam a apoptose dos osteoclastos (YANG et al., 1996 e GALEA; PRICE; LANYON, 2013).

O tratamento com raloxifeno apresenta um risco-benefício favorável para mulheres na menopausa que apresentam alto risco de fratura de vértebras decorrentes da osteoporose ou câncer invasivo de mama (GRADY et al., 2010).

Estudos de tratamento de superfície em ratos que foram induzidos à osteoporose e tratados com dois diferentes medicamentos, raloxifeno e alendronato, chegaram à conclusão de que os implantes realizados no grupo raloxifeno

apresentaram melhores resultados histológicos, de contato osso implante e de torque-reverso (RAMALHO-FERREIRA et al., 2015), além de compensar a diminuição da osseointegração em ratas osteoporóticas (FAVERANI et al., 2018).

Outro trabalho comparou implantes com superfície tratada com raloxifeno e aledronato em tibia de ratos. Os autores concluíram que o grupo controle e raloxifeno mostraram resultados semelhantes, porém o grupo raloxifeno apresentou redução do tempo para osseointegração, além de ter efeito positivo com a liberação local do medicamento (HARMANKAYA et al., 2013).

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta do tecido ósseo em função da superfície modificada por raloxifeno pelo método biomimético e tratada por duplo ataque ácido em modelo padronizado em tibia de rato.

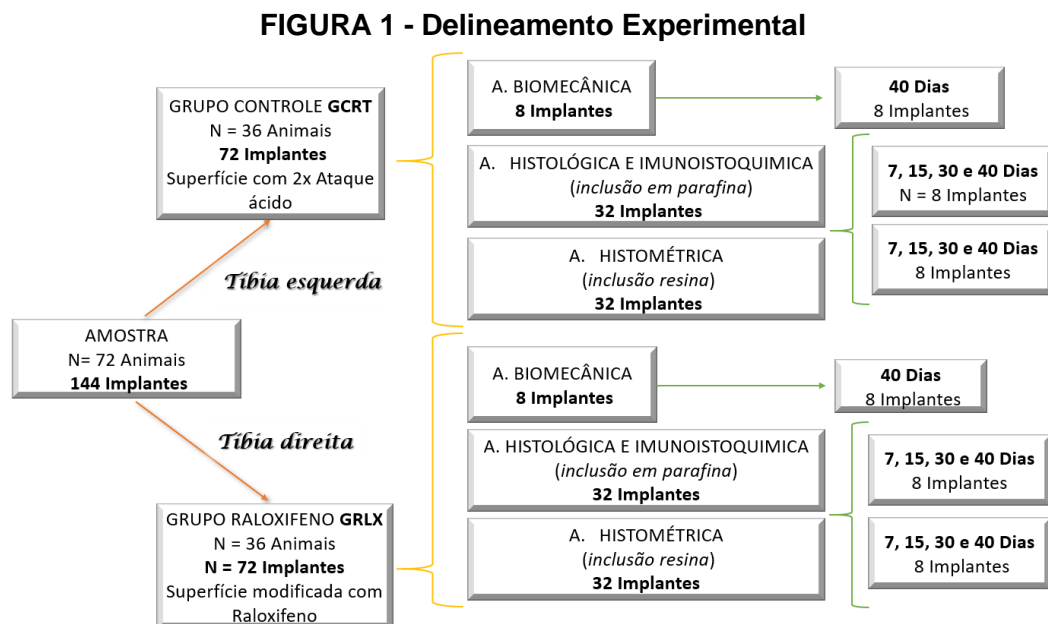
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 72 tíbias de ratos com o total de 144 implantes de 1,6 de diâmetro e 3,0 milímetros (mm) de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil) com duas superfícies diferentes:

- 1 – Implante de Tícp com superfície de duplo ataque ácido – 72 unidades
- 2 – Implante de Tícp com superfície modificada a base de raloxifeno a 1 miligrama por mililitro (mg/ml) – 72 unidades.

3.1 Delineamento Experimental

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), protocolo 2015-00612. Os mesmos animais foram enquadrados em dois grupos experimentais (Figura 1):



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

Grupo Controle (GCRT): implante de titânio de superfície tratada por duplo ataque ácido foi instalado na tíbia esquerda;

Grupo Raloxifeno (GRLX): implante de titânio com superfície modificada a base de fosfato de cálcio foi instalado na tíbia direita.

3.2 Preparação das Superfícies Teste e Controle

1ª Fase: Modificação por ácido:

Nesta fase, a superfície do implante de Tici sofreu uma subtração ácida por meio de banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico (Figura 2A, B e C), o qual provoca erosões na superfície implantar. A concentração dos ácidos, o tempo e a temperatura são fatores determinantes da microestrutura da superfície. Para o preparo da superfície, 144 implantes de titânio serão preparados.

FIGURA 2 - 1ª Fase de modificação por ácido do GCRT e do GRLX



- A) Modificação por subtração ácida em banhos de ácido nítrico;
- B) Ácido sulfúrico; e
- C) Ácido clorídrico.

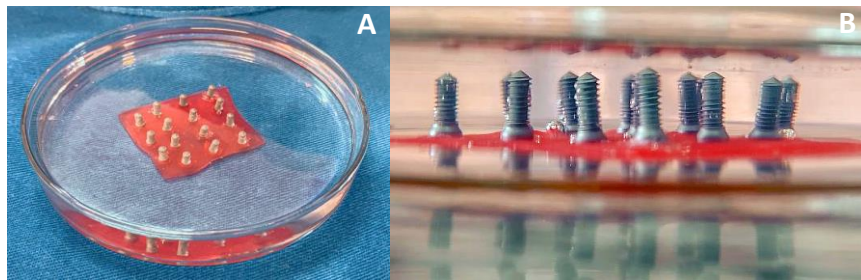
Fonte: Elaborado pelo autor (2018)

2ª Fase: Deposição de raloxifeno pelo método biomimético nos implantes teste:

Nesta outra fase, os implantes tiveram sua superfície modificada por raloxifeno segundo o método biomimético de modificação de superfície, que imita o processo biológico de formação de tecido duro em corpo (ABE, KOKUBO e YAMAMURO 1990 e APARECIDA et al. 2005, QUEIROZ et al., 2013) em dois ciclos. Eles foram imersos em 50 mililitros (ml) de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 5,0 Mol Litro (Mol.L-1) em estufa por um período de 24 horas a 60 graus célsius (°C) (Figura 3A e B), para a ativação da superfície. Os implantes foram mantidos em estufa por um período de 3 horas a 60°C para secagem da superfície. Posteriormente, os implantes foram imersos em 300 ml de solução de fluido corpóreo (SFC) modificada que simula os fluidos corpóreos por apresentar composição iônica e o potencial hidrogeniônico (pH) semelhantes ao do plasma sanguíneo (Figura 4A, B, C e D) com

1mg/ml de raloxifeno misturados pelo agitador até formar uma solução homogênea. Os implantes permaneceram imersos nesta solução por um período de 4 dias, em estufa a 37°C e pH 7.25, para se obter um recobrimento composto por raloxifeno (Figura 5A e B). A SFC foi trocada a cada 24 horas para que seja mantida a quantidade de íons em solução.

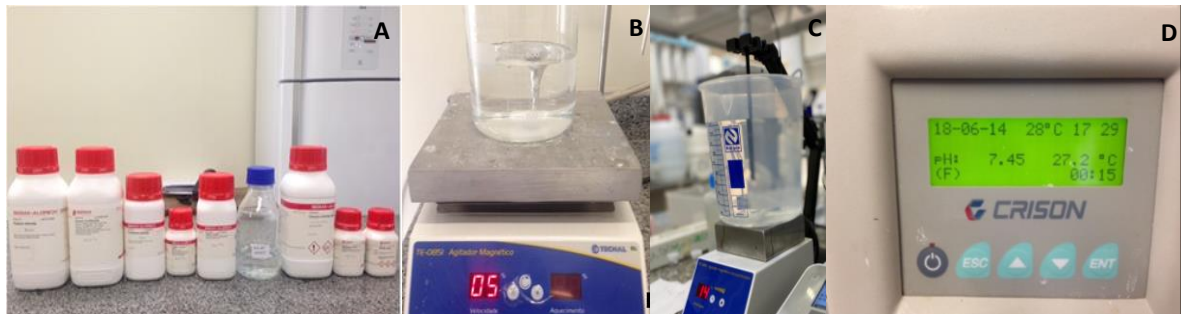
FIGURA 3 - Implantes imersos na solução de NaOH



- A) Implantes imobilizados verticalmente imersos pela solução de NaOH
B) Vista de perfil dos implantes na solução

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

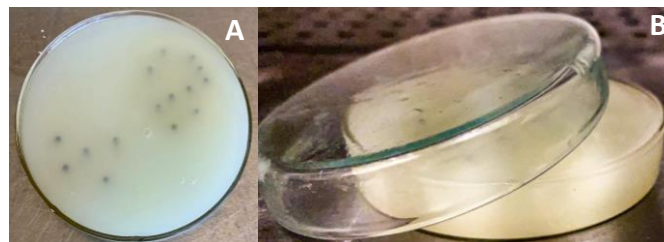
FIGURA 4 - Preparação do Simulador de Fluido Corpóreo



- A) Elementos químicos utilizados no preparo o SFC;
B) Homogeneização da solução com agitador orbita;
C) Ajuste do pH do SFC, e
D) Alcance do pH desejado

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

FIGURA 5 - Implantes imersos na solução de SFC com raloxifeno 1mg/ml



- A) Vista superior os implantes imersos pela solução de SFC com raloxifeno 1 mg/ml;
B) Placa de petri na estufa a 37°C.)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

Após esta fase, os implantes sofreram banhos:

1º Em água oxigenada volume 10 por 4 horas, com trocas periódicas de hora em hora.

2º Em solução salina fisiológica 0,9 porcentagem (%) por 10 minutos

3º Lavagem rápida em álcool absoluto

Após os banhos, os implantes foram mantidos em estufa por um período e 3 horas a 60°C para secagem da superfície

3.3 Procedimento Cirúrgico

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia por sedação foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50 a 70 miligrama por quilo (mg/Kg), e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 mililitro por quilo (ml/Kg) na metáfise tibial.

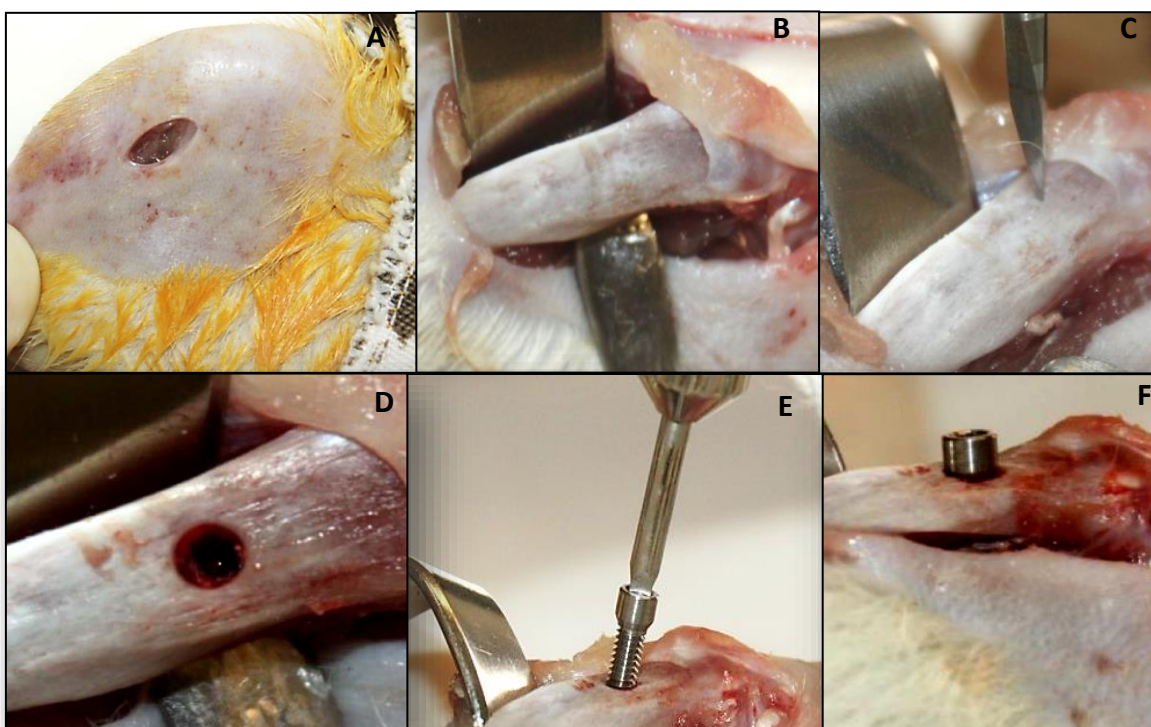
A tibia foi acessada após previa tricotomia da região lateral direita e esquerda e antisepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de povidona-iodo (PVP-I) ativo a 10% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de PVP-I ativo a 10% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos. As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), uma incisão linear por planos anatômicos de 1 centímetro (cm) foi feita na região lateral da metáfise tibial (Figura 6A). A pele e o perióstio foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição da porção lateral da metáfase tibial (Figura 6B).

Após exposição do tecido ósseo foi realizada osteotomia bi-cortical com fresa espiral de 1,4 mm de diâmetro (Figura 6C e 4D) montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, São Paulo, Brasil), que por sua vez estava conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rotação por minuto (rpm), sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Cada animal recebeu 2 implantes de titânio com travamento e estabilidade inicial, cada um de 1,6 de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico- Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil), sendo 1 em cada metáfise tibial (Figura 6E e F). Na tíbia direita foi instalado um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície modificada à base de raloxifeno e na tíbia esquerda um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície com duplo ataque ácido.

FIGURA 6 - Procedimento cirúrgico para a instalação dos implantes



Procedimento cirúrgico realizado bilateralmente:

- A) Após tricotomia e antisepsia, foi realizada incisão na região da metáfise tibial;
- B) Acesso à tíbia do animal;
- C) Osteotomia bicortical com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro
- D) Defeito ósseo de 1,4mm criado pela fresa;
- E) Instalação de implante de 1,6 x 3,0 mm de diâmetro, tratado ou não com raloxifeno; e
- F) Vista lateral de implante instalado bicorticalmente com estabilidade inicial.

Finalizada a instalação do implante, o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos. O plano muscular foi suturado por pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). No plano cutâneo, a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 4-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1 ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica 50 mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

4 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias, sendo 8 animais por período. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestésico para a remoção das tíbias do animal com margem de 1 cm de tecido ósseo do implante dentário. As peças cirúrgicas foram fixadas por 48 horas em formol (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, São Paulo, Brasil) neutro a 10% tamponado.

5 ANÁLISES

5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X

Os implantes foram analisados quanto à topografia, pré e pós-instalação nas tíbias dos animais, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) e finalmente, a espectrometria de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a formação da película de óxido e sua composição.

5.2 Análise Biomecânica (Torque-Reverso)

No momento da eutanásia no período de 40 dias, os implantes foram reabertos para exposição e realização do torque reverso. Um monta-implante (Implalife Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e um torquímetro analógico (15-BTG, Tohnichi, Tokyo, Japan) foi acoplado ao monta-implante. Um movimento anti-horário foi aplicado aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registra o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística.

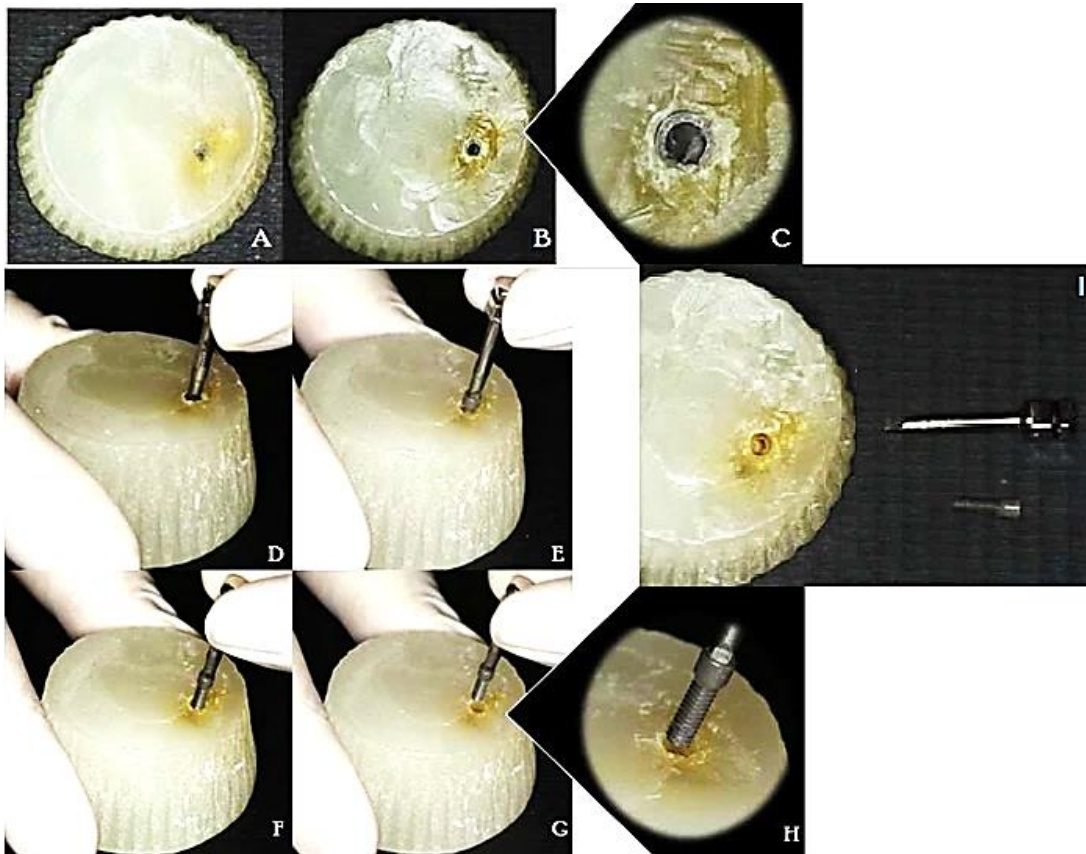
5.3 Análise Histológica

5.3.1 Processamento para Inclusão em Parafina

Após o período de 48 horas de fixação em formol, sessenta e quatro amostras sofreram descalcificação em etilenodiaminotetracético (EDTA) 20% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil), com trocas semanais da solução por um período de 4 a 6 semanas. Já descalcificadas, as peças foram desidratadas utilizando uma sequência de álcoois 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II, 100 III e álcool/xilol (1:1) com trocas de hora em hora. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada 1 hora e 45 minutos para posterior inclusão em parafina (Figura 7A,B,C,D,F,G,H e I) para obtenção de cortes com 5 micrometro (μm) de espessura e montados em

lâminas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e para as reações de imunohistoquímica.

FIGURA 7 - Sequência de remoção do implante da peça incluída em parafina



Sequência de remoção do implante após inclusão do espécime em parafina:

A e B) Vista superior;

C) Vista superior em maior aumento;

D, E e F) Vista de perfil do encaixe da chave para remoção do implante acoplada ao implante para remoção por meio de movimentos rotatórios;

G) Vista de perfil do implante removido;

H) Vista de perfil em maior aumento; e

I) Vista superior da peça de parafina, do implante removido, da chave para remover implante.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

Previamente à realização das análises histométrica e imunohistoquímica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceu quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc., NJ, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador

Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos Joint Photographics Experts Group (JPEG) e posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

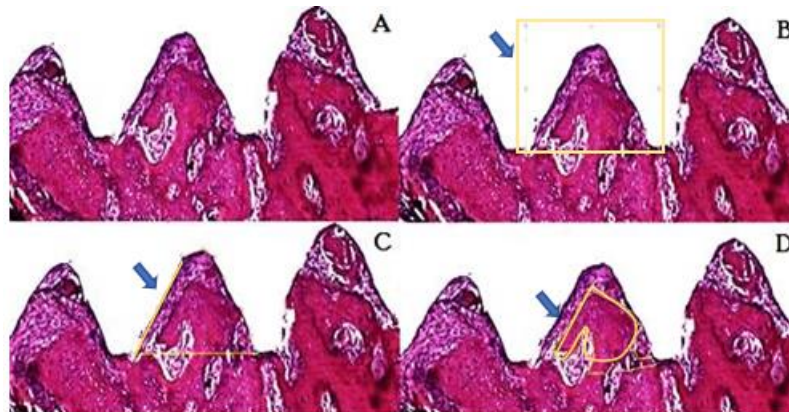
5.4 Análise Histométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems Ltda., Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região do implante instalado na metáfise tibial. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ Java 1.8 (Figura 8 A, B, C e D). Foram utilizadas as imagens obtidas em aumento de 400x e calculada, em porcentagem, a área de tecido ósseo presente (AO) entre as 3 espiras mais coronárias, localizadas em osso cortical em cada lado do implante. Foram calculadas, em porcentagem, a extensão linear de contato entre tecido ósseo de superfície do implante (ELCOI) e a área óssea neoformada (AON), compreendendo a área medular da tíbia na região implantada. Os valores de ELCOI e AON foram comparados para cada grupo entre si, nos três períodos de eutanásia (15, 30 e 40 dias) e para os diferentes grupos em cada período de avaliação.

FIGURA 8 - Sequência da seleção da área de interesse do implante por meio do uso do programa ImageJ



- A) Vista da área interface osso/implante selecionada para a análise histológica;
- B) Seleção de espira pelo programa ImageJ;
- C) Cálculo da área total da espira;
- D) Cálculo da área óssea neoformada por meio da seleção do seu contorno

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

5.5 Análise Iminoistoquímica

Para esta análise foram utilizadas lâminas separadas durante o processamento de inclusão em parafina. Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina (OPG) (OPG, Goat anti-opg SC21038 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América), ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANK-L) (Goat anti-rankl SC7627 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América), Osteocalcina (OC) (OC, Goat anti-ocSC18319 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América) e Colágeno-I (COL-1) (Goat anti-COL-I SC8788 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos da América). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

O anticorpo secundário biotilado foi o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin-SP-AffiniPure, donkey anti-goat imunoglobulina E 705065147– Jackson Immunoresearch Laboratories, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) bem como a expressão das proteínas OPG, RANKL, OC e COL-

1, acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo.

Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos (Quadro 1). O avaliador desconheceu o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise.

QUADRO 1 - Escores e frequência de porcentagem para análise de imunoistoquímica

Quantidade de Marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de marcação	-	0%
Marcação positiva	+	20% (Entre 10 à 30%)
Marcação superpositiva	++	60% (Entre 50 à 70%)
Marcação hiperpositiva	+++	90% (Entre 80 à 100%)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

5.6 Análise Estatística

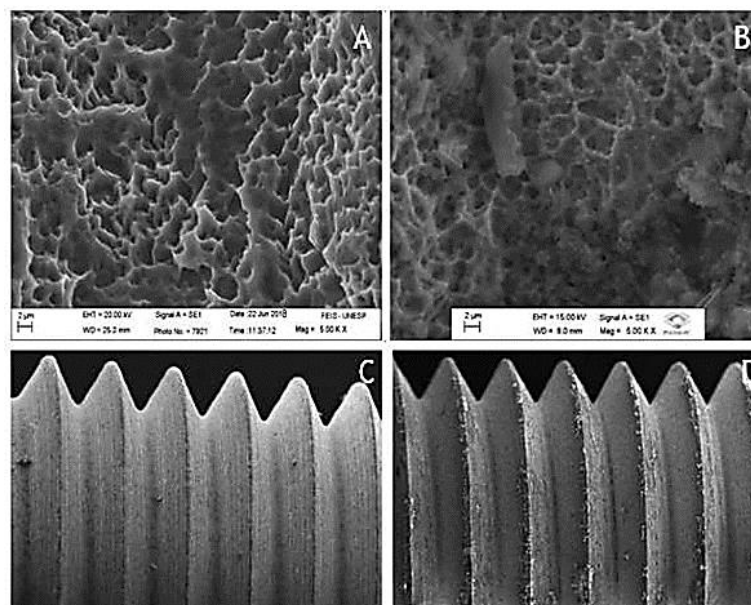
A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. Os testes foram conduzidos através de software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América), sendo realizados o teste T com pós teste Mann-Whitney para os valores do torque-reverso e análise de variância (ANOVA) 2 fatores, com pós teste Tukey para os valores da AON e ELCOI, utilizados para análise estatística em estudos na área de saúde, com relevância de ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios X

A MEV revela no grupo controle uma superfície rugosa, porém mais homogênea, com estrutura mais espessa (Figura 9 A e C). Enquanto a superfície do grupo tratado se apresenta mais rugosa, com partículas de raloxifeno depositadas entre as espiras (Figura 9 B e D).

FIGURA 9 - MEV do GCRT e do GRLX

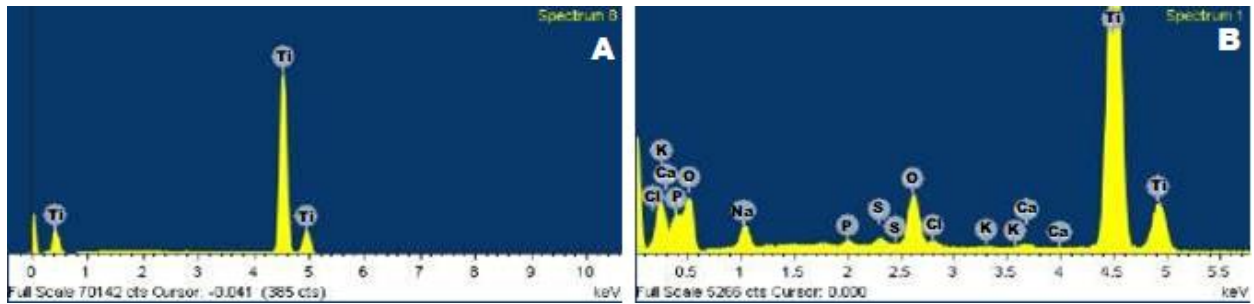


- A) Região cervical do implante do GCRT;
 B) Região cervical do implante do GRLX;
 C) Vista em maior aumento da região cervical do implante do GCRT;
 D) Vista em maior aumento da região cervical do implante do GRLX.

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2018)

Na análise topográfica foi possível observar grande quantidade de elementos na superfície tratada com Raloxifeno, além do titânio. Como oxigênio (O), Cálcio (Ca), Cloro (Cl), Sódio (Na), Fósforo (P), Enxofre (S) (Figura 10A). Diferente do grupo controle, o qual mostrou a presença de 100% de titânio na superfície (Figura 10B). Isso se deve ao tipo de tratamento, pelo tratamento com raloxifeno adicionar partículas na superfície do implante, enquanto o tratamento com duplo ataque ácido ocorre por subtração de substância.

FIGURA 10 - EDR dos GCRT (A) e GRLX (B)



Energia Dispersiva de Raios X com destaque aos elementos químicos:

A) Encontrados na superfície do implante do GCRT; e

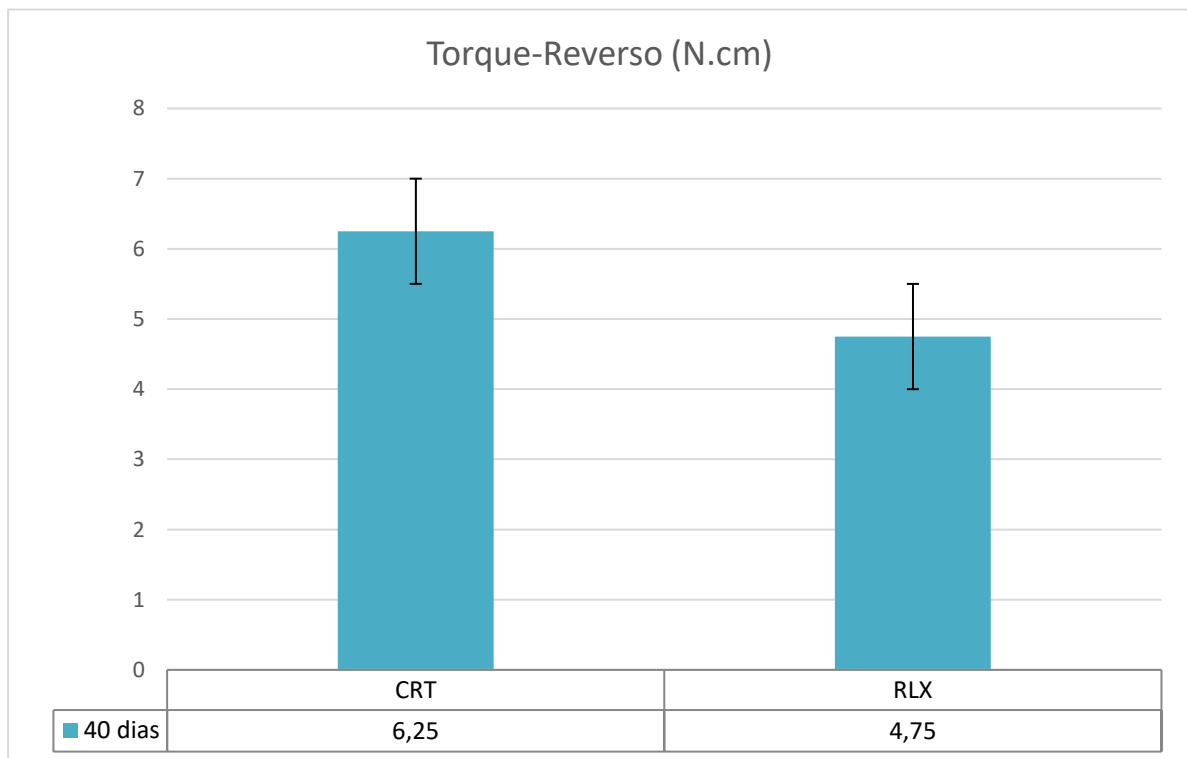
B) Encontrados na superfície dos implantes do GRLX.

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2018)

6.2 Análise Biomecânica (Torque Reverso)

Adotando o nível de significância (p) $p < 0,05$. Não foi observada diferença estatística ($p=0,130$) para os valores de torque reverso entre os GCRT e GRLX para o tempo de 40 dias (Gráfico 1) (Quadro 2).

GRÁFICO 1 - Torque Reverso do GCRT e do GRLX aos 40 dias de eutanásia



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

QUADRO 2 - Análise estatística da análise de torque-reverso para os GCRT e GRLX aos 40 dias de eutanásia

Período de Eutanásia	GCRT	GRLX	<i>p</i>
40 Dias	6,25	4,75	0,13

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Valores médios do torque reverso para os GCRT e tratado GRLX, não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).


6.3 Análise Histológica

Não foi observado processo inflamatório exarcebado associado ao raloxifeno em qualquer um dos períodos.

6.3.1 Grupo controle

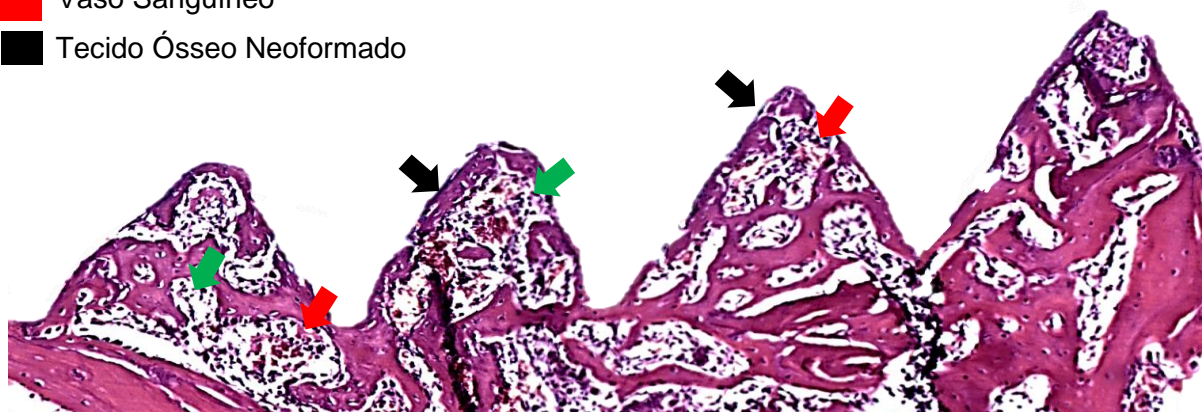
No período de 7 dias observa-se, na interface osso/implante, principalmente tecido conjuntivo e matriz osteoide sendo depositada de forma homogênea na região de vale, entre as espiras, formação de trabéculas ósseas finas, principalmente na região cortical, pouca formação de tecido ósseo em área medular. Além disto nota-se a presença de poucos vasos sanguíneos, entre a região de espiras, com um entremeado de tecido conjuntivo e pouco tecido ósseo neoformado, evidenciando o início da angiogênese (Figura 11).

FIGURA 11 - Histológico do período 7 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.

 Tecido Conjuntivo

 Vaso Sanguíneo

 Tecido Ósseo Neoformado

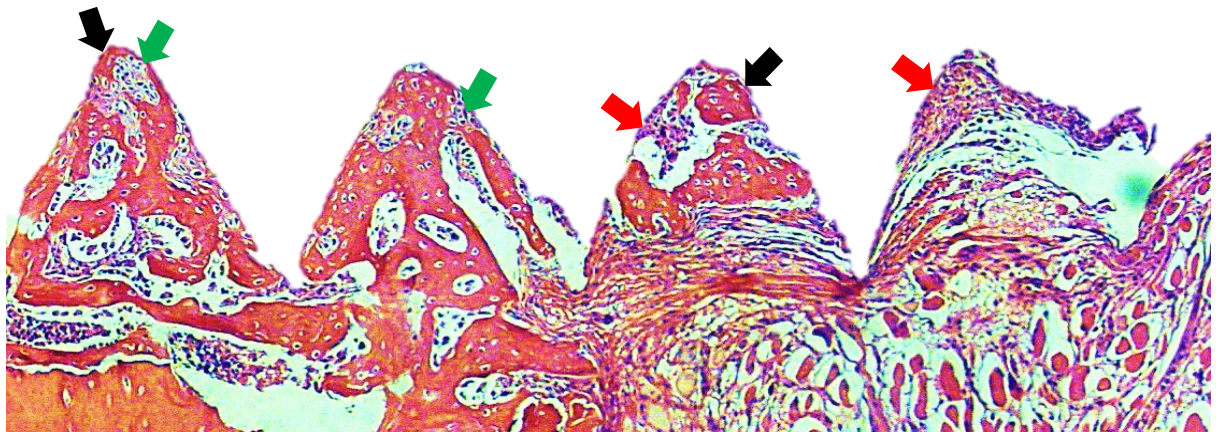


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

No período de 15 dias observa-se a formação de trabéculas mais espessas, em comparação ao período anterior, principalmente na região da interface osso/implante, apresentando matriz osteoide entremeada às áreas de tecido ósseo neoformado, que por sua vez, apresenta-se com inúmeras células osteoblásticas e osteoclastos na periferia, indicando remodelação do tecido. Além disto é possível notar o aumento do acúmulo de vasos sanguíneos em tecido conjuntivo, o qual está passando pelo processo de mineralização (Figura 12).

FIGURA 12 - Histológico do período 15 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.

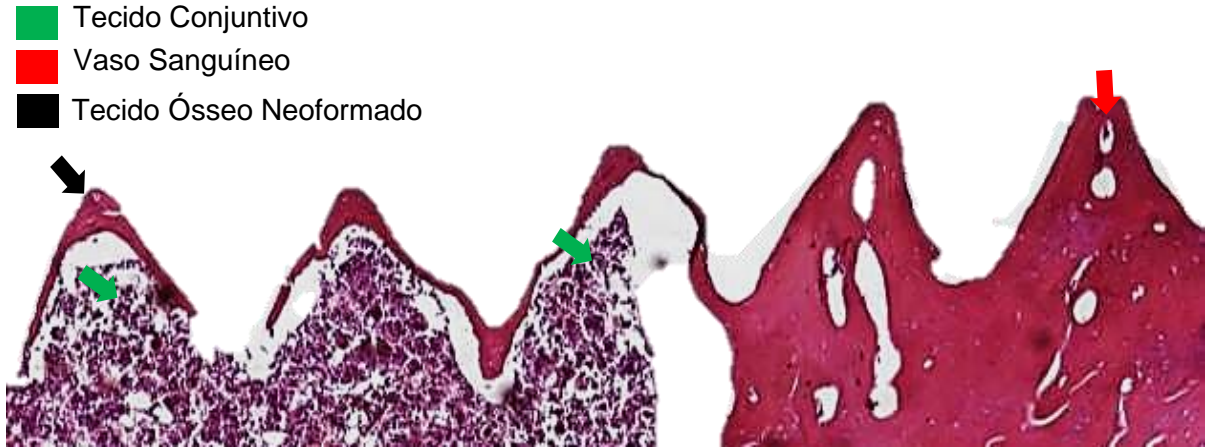
- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

O período de 30 dias é caracterizado pela fase de maior taxa de remodelação óssea, com isso, pode-se destacar a presença de tecido ósseo disposto em finas trabéculas na região de superfície da interface osso/implante com células osteoblásticas, tendo maior prevalência de tecido conjuntivo frouxo localizado sob esta camada de tecido ósseo neoformado, com inúmeros osteoclastos localizados na interface da área de tecido ósseo. Assim como também apresentou vasos sanguíneos calibrosos entremeados em tecidos ósseo e conjuntivo, de forma dispersa (Figura 13).

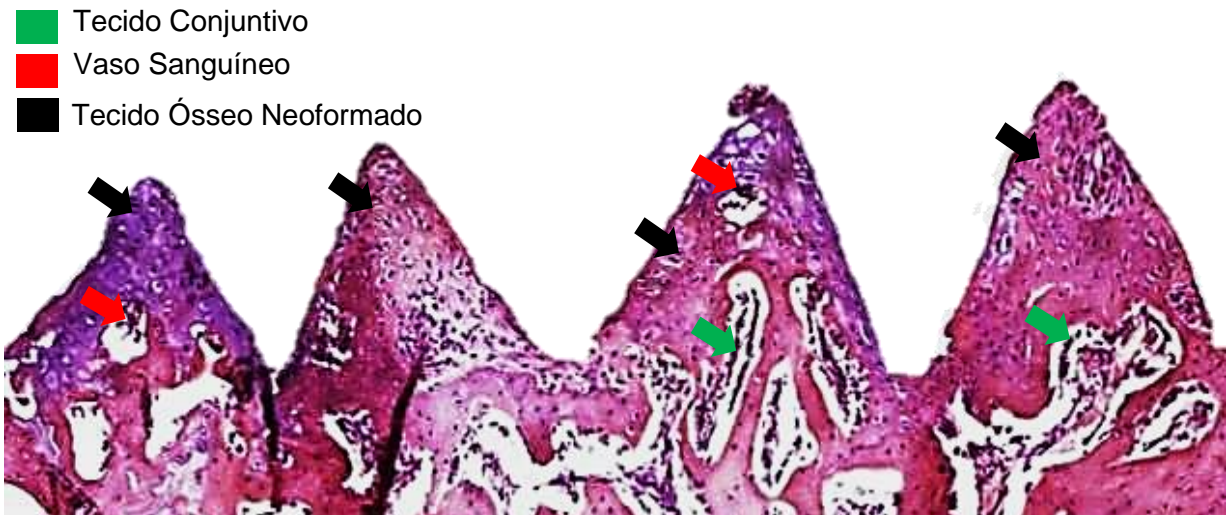
FIGURA 13 - Histológico do período 30 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Aos 40 dias observa-se maior prevalência de tecido ósseo, evidenciando uma formação mais madura desse tecido, quando comparado aos outros períodos, com menor expressão de tecido conjuntivo, entre as espiras, com a presença de vasos sanguíneos e matriz osteoide entremeada em regiões de tecido ósseo, que por sua vez, possui inúmeros osteoblastos, principalmente na área de interface osso/implante (Figura 14).

FIGURA 14 - Histológico do período 40 dias do GCRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.



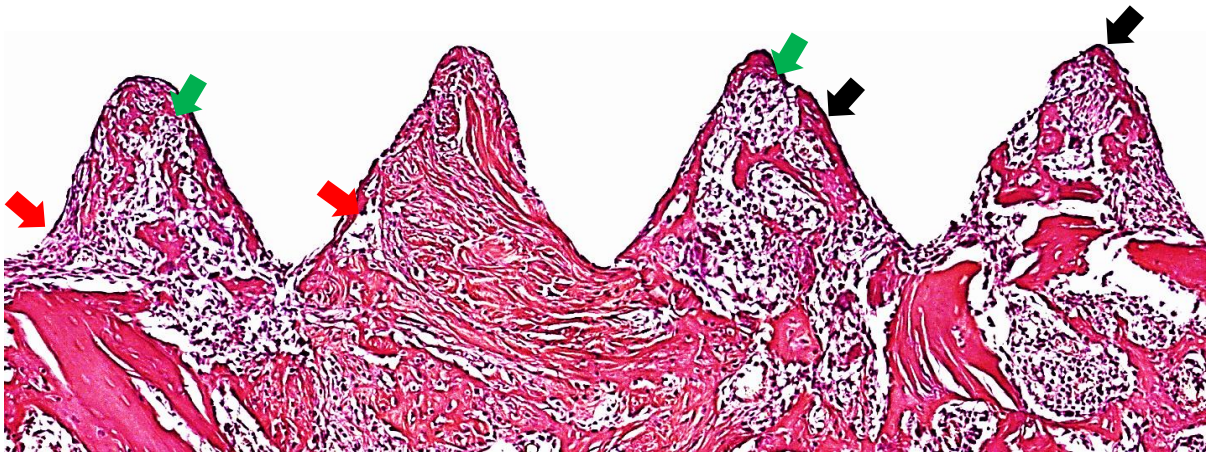
Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

6.3.2 Grupo modificado por raloxifeno

No período de 7 dias observa-se na região de interface osso/implante a presença de tecido conjuntivo, com aglomerados de vasos sanguíneos e matriz osteoide disposta de forma homogênea contornando a região periférica da interface osso/implante. Quando observado as áreas ósseas neoformadas, estas apresentam-se com finas trabéculas entremeadas no tecido conjuntivo (Figura 15).

FIGURA 15 - Histológico do período 7 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.

- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

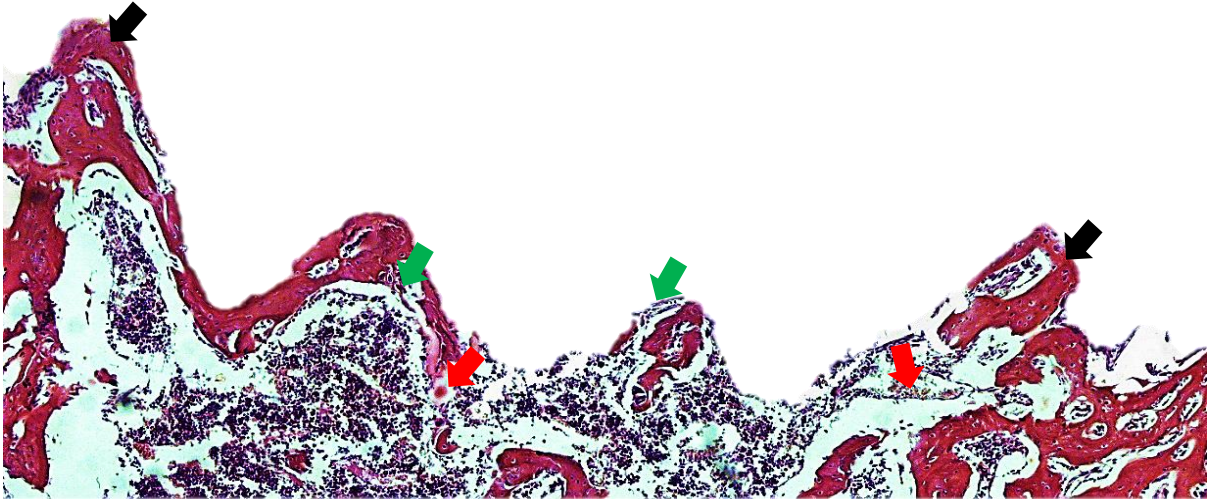


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Aos 15 dias observa-se maior expressão de trabéculas ósseas, sendo mais espessas quando comparadas com o período anterior, e com presença de osteoblastos e osteócitos em sua porção mais interna, dispondo-se de forma entremeada ao tecido conjuntivo, que por sua vez, apresenta-se com maior expressão de vasos sanguíneos dispersos em toda a região do delta entre as espiras, inclusive abaixo da região do vale do implante e com a presença de matriz osteoide entre o tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo (Figura 16).

FIGURA 16 - Histológico do período 15 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo

- Tecido Conjuntivo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

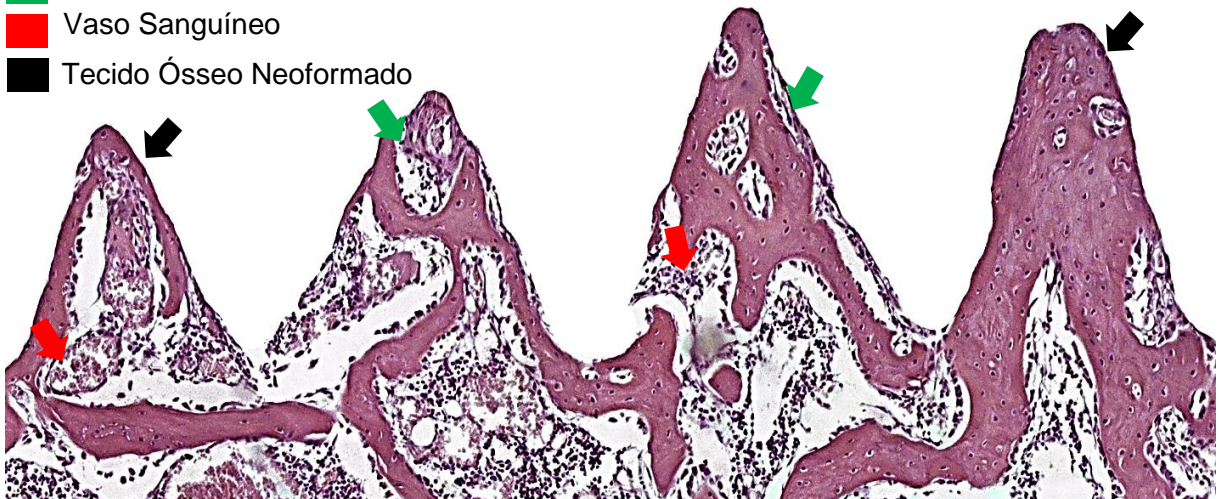


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

No período de 30 dias observa-se maior expressão de trabéculas ósseas neoformadas e matriz de osteoide disposta tanto na região de interface osso implante quanto entremeadado no tecido conjuntivo, principalmente em região medular. Assim como também é possível notar, no tecido conjuntivo, maior prevalência de vasos sanguíneos (Figura 17).

FIGURA 17 - Histológico do período 30 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo

- Tecido Conjuntivo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

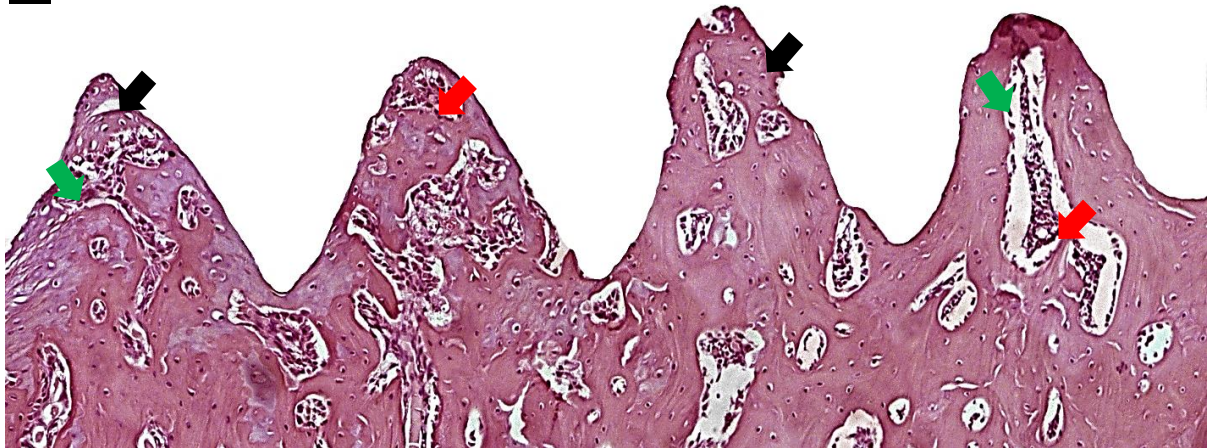


Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Aos 40 dias observa-se trabéculas ósseas mais espessas, com características de tecido mais maduro na região cortical. Porém, na região medular, ainda existe grande quantidade de tecido conjuntivo, com formação óssea apenas na interface osso/implante na maioria das amostras. Porém, o tecido conjuntivo presente entre as espiras se apresenta de forma mais densa e mais organizada, quando comparado ao grupo controle. Além disso, há a presença de vasos sanguíneos calibrosos em meio ao tecido ósseo. (Figura 18).

Figura 18 - Histológico do período 40 dias do GRLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado. Objetiva 40x coloração HE.

- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

6.4 Análise Imunoistoquímica

Foram selecionados os períodos de 15, 30 e 40 dias dos GCRT e GRLX para a análise imunoistoquímica. Não foram utilizadas as lâminas do período de 7 dias, pois não acrescentariam diferenças significativas.

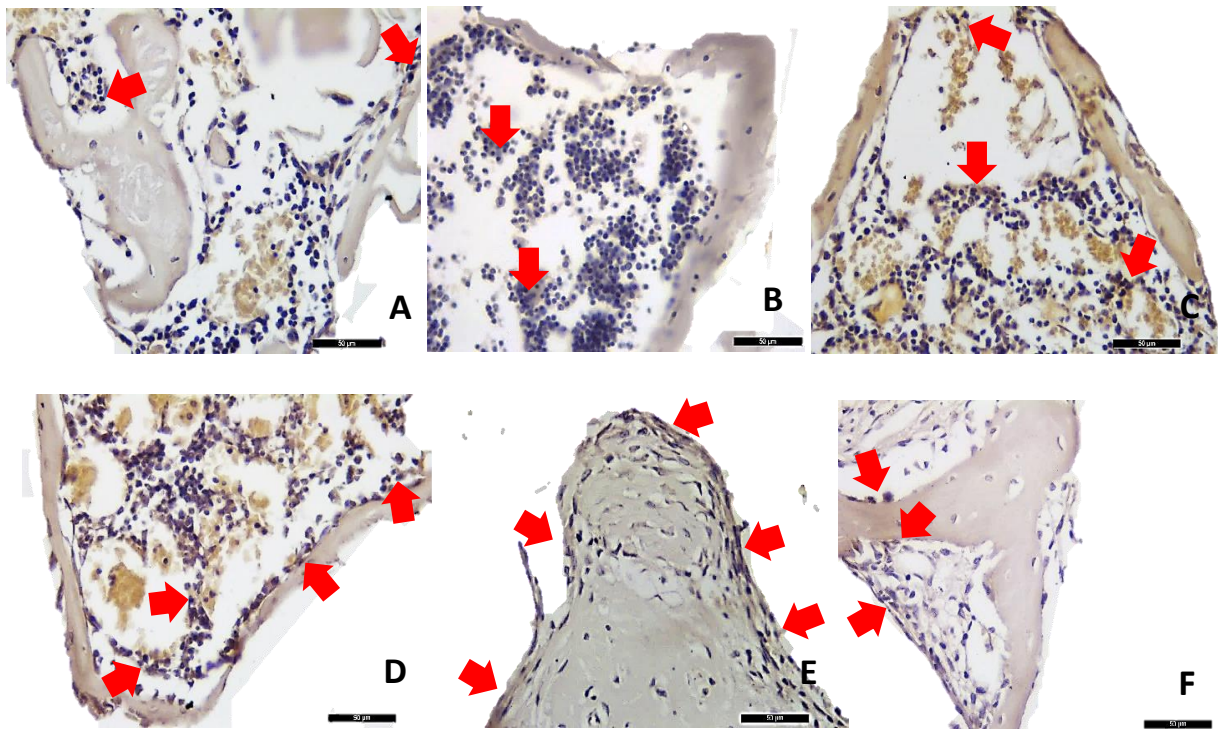
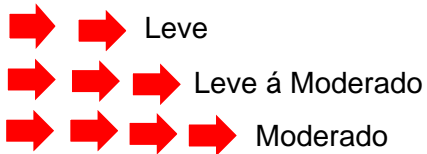
6.4.1 Colágeno

A imunomarcagem para COL-1, nos períodos de 15 e 30 dias do GCRT, apresentou-se leve, em contrapartida no GRLX apresentou-se moderado. Neste contexto, é importante salientar a ativação proteica destes períodos iniciais, proliferativos, e de remodelação dado pelo GRLX, apresentando uma linhagem de

osteoblastos e matriz de tecido conjuntivo expressiva. Visto que apenas no período de 40 dias, ambos os grupos apresentaram imunomarcagem semelhantes, de leve a moderada. Com isso, destaca-se o comportamento do GRLX, em que houve o aumento da linhagem de osteoblastos e de matriz conjuntiva. Já em relação ao GCRT é dado um ponto de equilíbrio do metabolismo ósseo dentro deste intervalo de tempo, no qual os osteoblastos se encontram concentrados na região mais interna entre as espiras do implante (Figura 19).

FIGURA 19 - Lâminas marcadas pela proteína COL-I nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX

Padrão Adotado para Imunomarcagem:



- A) GCRT aos 15 dias apresentou imunomarcagem leve;
 B) GCRT aos 30 dias apresentou imunomarcagem leve;
 C) GCRT aos 40 dias apresentou imunomarcagem de leve a moderada;
 D) GRLX aos 15 dias apresentou imunomarcagem moderada;
 E) GRLX aos 30 dias apresentou imunomarcagem moderada, e
 F) GRLX aos 40 dias apresentou imunomarcagem e leve a moderada.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

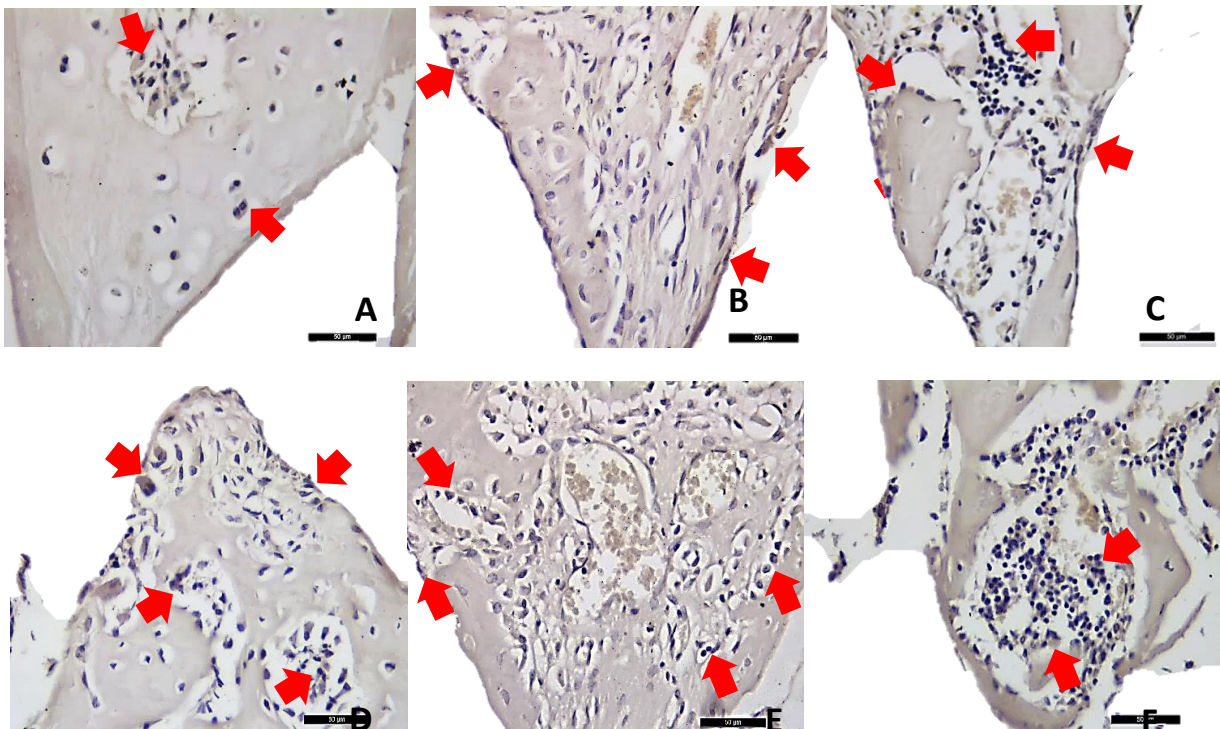
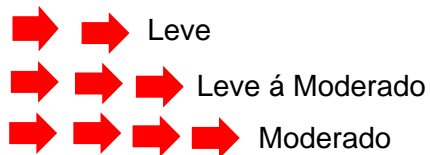
6.4.2 Ligante do receptor ativador nuclear kappa b

A imunomarcção dos períodos de 15, 30 e 40 dias apresentaram-se distintas entre os grupos estudos. Visto que o comportamento do GCRT apresentou imunomarcção leve aos 15 e de leve a moderada aos 30 dias. Em contra partida ao analisar o GRLX, a imunomarcção apresentou-se moderado em ambos períodos.

Por fim aos 40 dias o GCRT apontou imunomarcção de leve a moderado e o GRLX leve, resultando na marcação positiva na matriz extracelular e nas células da linhagem osteoblástica (Figura 20).

FIGURA 20 - Lâminas marcadas pela proteína RANK-L nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX

Padrão Adotado para Imunomarcção:



- A) GCRT aos 15 dias apresentou imunomarcção leve;
- B) GCRT aos 30 dias apresentou imunomarcção de leve a moderado;
- C) GCRT aos 40 dias apresentou imunomarcção de leve a moderado;
- D) GRLX aos 15 dias apresentou imunomarcção moderada;
- E) GRLX aos 30 dias apresentou imunomarcção moderada e
- F) GRLX aos 40 dias apresentou imunomarcção leve.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

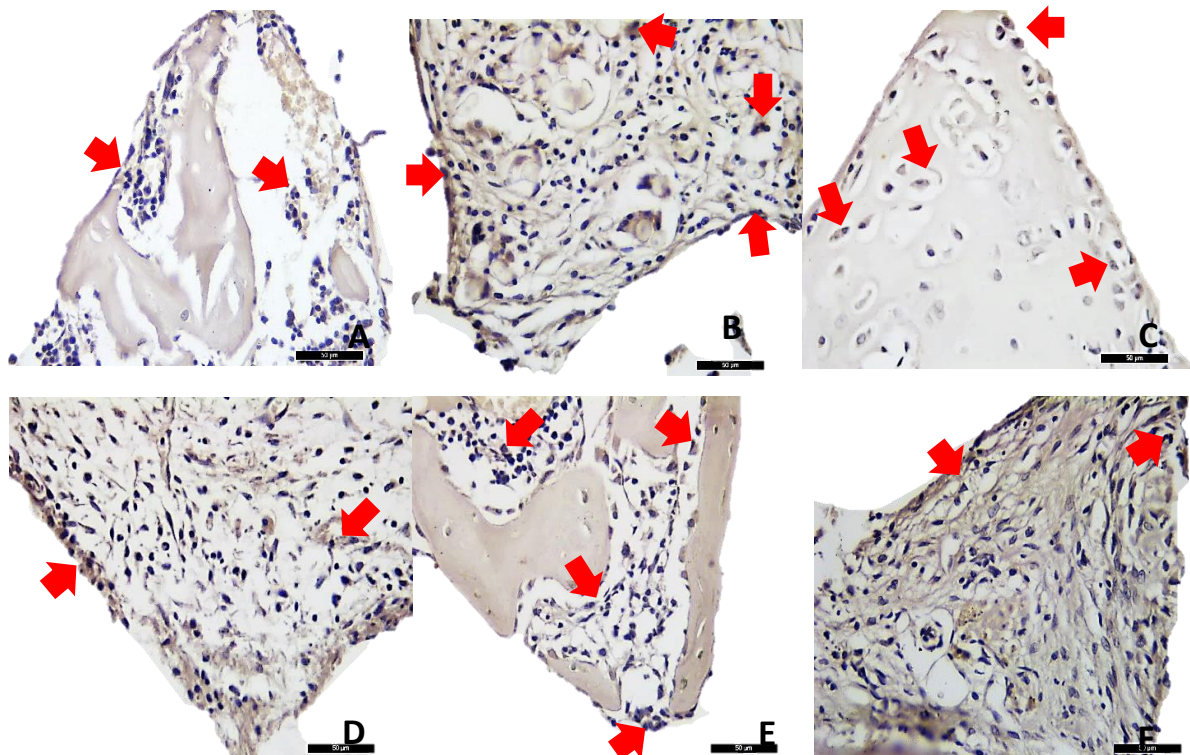
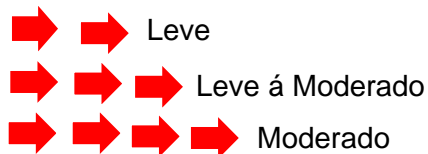
6.4.3 Osteoprogesterina

Nos períodos de 15 dias a imunomarcagem para OPG apresentou-se leve em ambos os grupos estudados e os 30 dias a imunomarcagem para OPG apresentou-se moderada para ambos os grupos.

No entanto, aos 40 dias, enquanto o GCRT mostrou uma imunomarcagem moderada, o GRLX apresentou imunomarcagem leve. Com isso, tem-se que os scores dos períodos de 15 e 40 dias do GRLX apresentaram imunomarcagem leve, corroborando assim com a análise histológica realizada, mostrando pouco tecido mineralizado (Figura 21).

FIGURA 21 - Lâminas marcadas pela proteína OPG nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias dos GCTR e GRLX

Padrão Adotado para Imunomarcagem:



- A) GCRT aos 15 dias apresentou imunomarcagem leve;
 B) GCRT aos 30 dias apresentou imunomarcagem moderada;
 C) GCRT aos 40 dias apresentou imunomarcagem moderada imunomarcagem;
 D) GRLX aos 15 dias apresentou imunomarcagem leve;
 E) GRLX aos 30 dias apresentou imunomarcagem moderada; e
 F) GRLX aos 40 dias apresentou imunomarcagem leve.




6.4.4 Osteocalcina

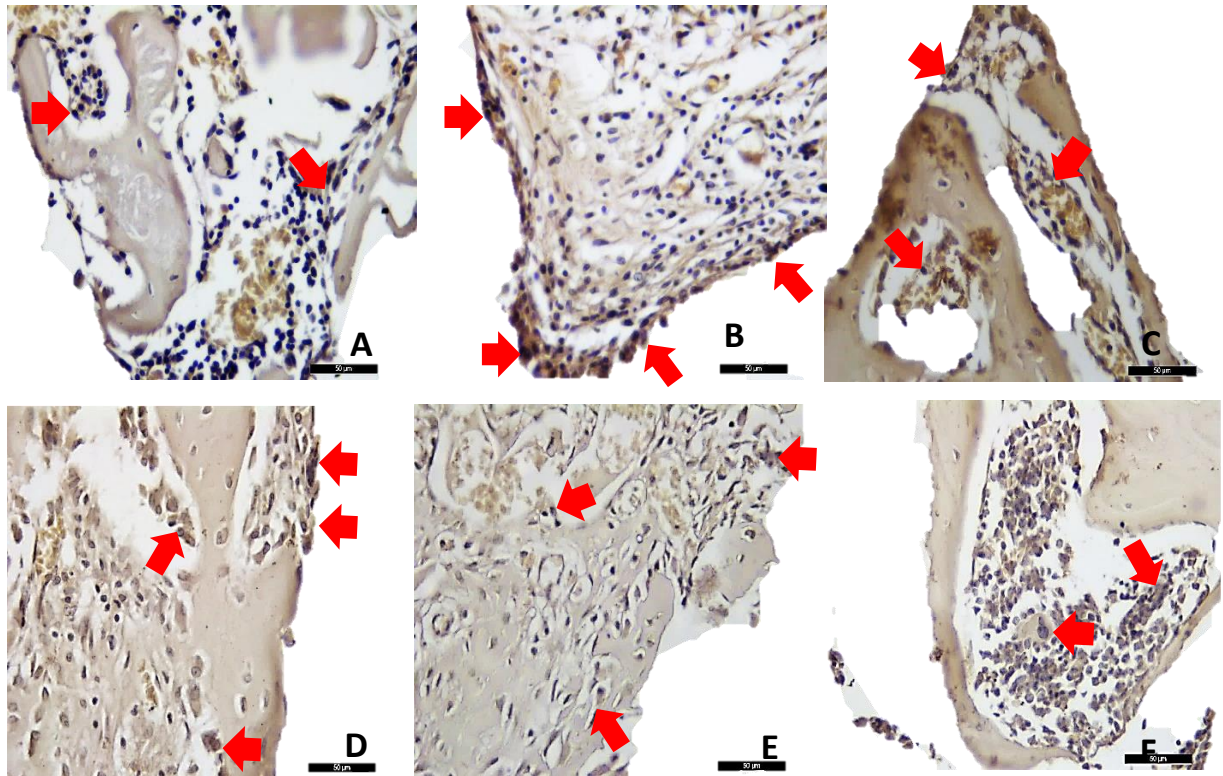
No período de 15 dias o GCRT apresentou imunomarcção leve, enquanto o GRLX moderada. Em sequência, aos 30 dias, o GCRT apresentou imunomarcção moderada e o GRLX leve a moderada. Por fim, aos 40 dias, o GCRT mostrou imunomarcção leve a moderado e o GRLX leve.

Ao avaliar o comportamento do GRLX, visando a imunomarcção da OC, tem-se que este grupo revela ter uma resposta rápida para a ativação celular dos osteoblastos, porém, com ação a longo prazo quando comparado com o GCRT. Este resultado leva a entender a razão da não-significância estatística quando realizado a análise por torque-reverso, pois havia pouco tecido mineralizado sendo marcado aos 40 dias pelo GRLX, não destacando-se em relação ao GCRT (Figura 22).

FIGURA 22 - Lâminas marcadas pela proteína OC nos períodos de eutanásia 15, 30 e 40 dias do GCTR e do GRLX

Padrão Adotado para Imunomarcção:

-  Leve
 Leve á Moderado
 Moderado



- A) GCRT aos 15 dias apresentou imunomarcção leve;
 B) GCRT aos 30 dias apresentou imunomarcção moderado;
 C) GCRT aos 40 dias apresentou imunomarcção de leve a moderado;
 D) GRLX aos 15 dias apresentou imunomarcção moderada;
 E) GRLX aos 30 dias apresentou imunomarcção leve a moderada; e
 F) GRLX aos 40 dias apresentou imunomarcção e leve.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Nos períodos selecionados 15, 30 e 40 dias dos grupos estudados para a análise imunoistoquímica, pode-se resumir os escores em um quadro de imunomarcção (Quadro 3).

QUADRO 3 - Escores da análise de imunoistoquímica nos períodos de 15,30 e 40 dias do GCRT e do GRLX

Anticorpos Analisados		COL-1		RANK-L		OPG		OC	
Grupos		CRT	RLX	CRT	RLX	CRT	RLX	CRT	RLX
Período de Eutanásia	15 dias	Leve	Moderado	Leve	Moderado	Leve	Leve	Leve	Moderado
	30 dias	Leve	Moderado	Leve a Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Leve a Moderado
	40 dias	Leve a Moderado	Leve a Moderado	Leve a Moderado	Leve	Moderado	Leve	Leve a Moderado	Leve

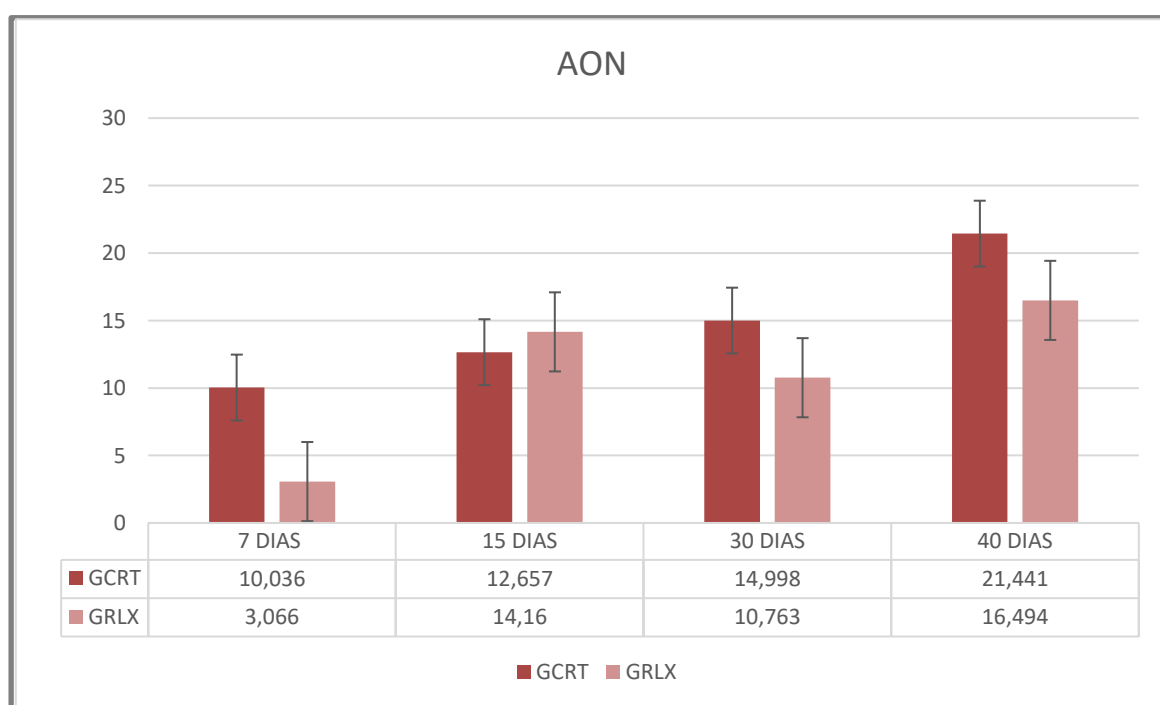
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018)

6.5 Análise Estatística

Após a realização da histomorfometria, os dados foram submetidos à análise estatística. Por meio dos dados submetidos à análise da AON, foi possível observar, na comparação entre os grupos, diferença estatística entre os GCRT e GRLX durante os períodos de 7 ($p=0,005$) e 40 dias ($p=0,04$).

Já na comparação intergrupo, foi possível observar diferença estatística significativa entre os períodos 7, 15 e 30 quando comparados aos 40 dias para o GCRT e no GRLX, entre os períodos 15, 30 e 40 quando comparados aos 7 dias (Gráfico 2) (Tabela 1).

GRÁFICO 2 - Valores AON do GCRT e do GRLX



Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

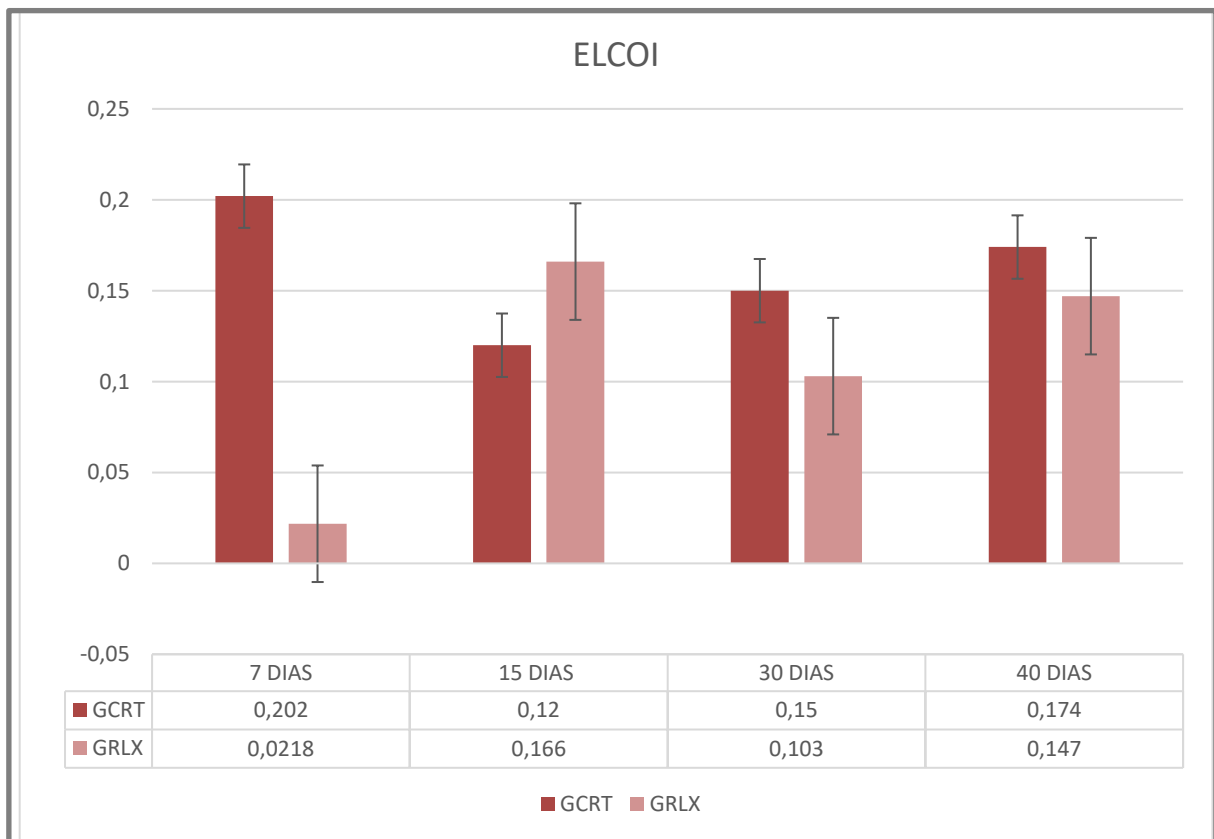
TABELA 1 - Análise comparativa da AON em percentagem

Periods	GCRT	GRLX	p value
	Mean ± SD	Mean ± SD	
7 days	0,20 ± 0,28 ^{Aa}	0,02 ± 0,02 ^{Ba}	< 0,005*
15 days	0,120 ± 0,03 ^{Aa}	0,16 ± 0,15 ^{Bb}	< 0,526
30 days	0,15 ± 0,27 ^{Aa}	0,10 ± 0,06 ^{Bc}	< 0,078
40 days	0,17 ± 0,05 ^{Aa}	0,15 ± 0,13 ^{Bd}	< 0,040*
	p value	< 0,046*	< 0,046*

* Statistically significant value ($p < 0.05$ by ANOVA TWO AWAY test). A and B: shows the difference between the groups in the same period ($p < 0.05$ by Tukey test); a, b and c: shows the difference between the period in the same group ($p < 0.05$ by Tukey test). MD = mean; SD = standard deviation;

Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

Para os dados submetidos à análise de ELCOI, foi possível observar diferença estatística significativa no GRLX, entre os períodos de 15 e 7 dias ($p=0,03$). Além disso, na comparação entre os dois grupos, observou-se diferença estatística durante o período de 7 dias ($p<0,001$). Os períodos de 15, 30 e 40 dias não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) (Gráfico 3) (Tabela 2).

GRÁFICO 3 - Valores ELCOI do GCRT e do GRLX

Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

TABELA 2 - Análise comparativa do ELCOI em percentagem

<i>Periods</i>	GCRT	GRLX	<i>p value</i>
	<i>Mean ± SD</i>	<i>Mean ± SD</i>	
7 days	10,04 ± 8,15 ^{Aa}	3,07 ± 2,02 ^{Ba}	< 0,001*
15 days	12,66 ± 2,82 ^{Aa}	14,16 ± 4,75 ^{Bb}	< 0,362
30 days	14,99 ± 5,09 ^{Aa}	10,76 ± 6,80 ^{Bc}	< 0,354
40 days	21,44 ± 5,23 ^{Aa}	16,49 ± 7,57 ^{Bd}	< 0,601
	<i>p value</i>	< 0,003*	< 0,003*

* Statistically significant value ($p < 0.05$ by ANOVA TWO AWAY test). A and B: shows the difference between the groups in the same period ($p < 0.05$ by Tukey test); a, b and c: shows the difference between the period in the same group ($p < 0.05$ by Tukey test). MD = mean; SD = standard deviation;

Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa, referente à modificação de superfície de implantes de Tícp, foram esclarecedores para entender o comportamento do raloxifeno em indivíduos normofisiológicos. Visando, de fato, compreender se este medicamento poderia alterar o processo de neoformação óssea, como proposto na literatura, em situações com alterações sistêmicas (APOSTU et al., 2017).

De acordo com as hipóteses deste trabalho, é possível afirmar que os resultados qualitativos e quantitativos, de forma geral, dos grupos estudados, não apresentaram grande discrepância entre si.

As análises de espectrometria recentemente encontradas na literatura indicam que o raloxifeno promove a liberação de componentes químicos de ação local como: Carbono (C), O, P, Ca e Na (SILVA, 2018), além de S e Nitrogênio (N) (HARMANKAYA et al., 2013). Corroborando com estes resultados, este estudo apresentou os elementos químicos: Na, O, Ca, P e S; e em aditivo: Cl. Sendo que a presença de S comprova a adesão bem-sucedida do medicamento, com liberação progressiva do raloxifeno (HARMANKAYA et al., 2013).

Além da composição química da superfície do implante, a caracterização topográfica favorece a proliferação celular devido à maior porosidade (HARMANKAYA et al., 2013). Da mesma forma, a topografia de superfície apresentou maior porosidade no grupo modificado por raloxifeno em relação ao grupo controle, corroborando com a literatura. Além disso, em maior aumento, é possível observar a deposição de partículas de raloxifeno na superfície dos implantes modificados.

Os parâmetros referentes à análise biomecânica, disponíveis em demais estudos, revelam que os ratos correspondentes ao grupo tratado sistemicamente com raloxifeno, nos quais, foram induzidos a osteoporose, não apresentaram valores estatísticos significantes ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle, no qual não foi induzido osteoporose, (RAMALHO-FERREIRA, 2014; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015) o que corrobora com os resultados do presente trabalho, que por sua vez, não testou animais sistemicamente comprometidos e não apresentou diferença estatística de torque-reverso entre o GCRT e GRLX aos 40 dias. Em justificativa, a análise de imunistoquímica apresenta alteração da marcação para a OC aos 40 dias, em que o GRLX denota imunomarcação leve, enquanto o GCRT de leve a moderada. Ou

seja, o GCRT, neste período, apresentou maior quantidade de matriz óssea mineralizada, influenciando em valores superiores aos do GRLX na análise de torque-reverso.

Contudo, vale salientar que também é encontrado na literatura melhores resultados de torque-reverso do grupo raloxifeno em relação aos demais grupos estudados, (HARMANKAYA et al.; 2013 e FAVERANI et al., 2018), logo é fundamental a realização de novos estudos para ratificar esta análise.

Na análise histomorfométrica observou-se que ao comparar o GCRT e o GRLX para os valores obtidos de AON, tanto o período de 7 dias como o período de 40 dias, apresentaram diferença estatística de ($p=0,005$) e ($p=0,04$). Assim como, no GRLX os períodos de 15, 30 e 40 dias, apresentaram diferença estatística em relação aos 7 dias. Visto que na fase inicial o GRLX se destaca por possuir maior quantidade de tecido conjuntivo em relação ao GCRT. Diante disto, a literatura traz que o grupo modificado por raloxifeno e o grupo controle, apresentaram melhores resultados histológicos, de neoformação óssea em regiões de reparo ósseo, em relação aos demais grupos estudados (RAMALHO-FERREIRA, 2014; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015; FAVERANI et al., 2018). Em contrapartida, há também estudos que relatam que o alendronato obteve melhores resultados no quesito área óssea neoformada, sendo superior ao grupo raloxifeno, e este foi superior ao grupo controle (HARMANKAYA et al.; 2013).

O fato de que o GRLX apresentou mais áreas de tecido conjuntivo em relação ao GCRT, corrobora com a diferença estatística na análise de ELCOI entre o GCRT e GRLX, no período de 7 dias. Além disso, o GRLX apresentou diferença estatística ($p=0,03$) entre suas amostras de 7 e 15 dias, indicando que houve um aumento considerável da corticalização óssea, apesar de não ter diferença estatística com o GCRT em nenhum dos períodos após os 7 dias, apresentando no fim, resultados semelhantes. No entanto, a literatura traz resultados distintos, pois pesquisas revelam que a superfície de contato na área osso/implante do grupo modificado por raloxifeno, em ratas com osteoporose induzida, apresenta valores superiores ou semelhantes em relação ao grupo controle (HARMANKAYA et al., 2013; RAMALHO-FERREIRA, 2014, RAMALHO-FERREIRA et al., 2015 e FAVERANI et al., 2018).

A análise de imunoistoquímica indica a atividade do metabolismo ósseo, em outras palavras do seu turnover (FAVERANI et al., 2018; LUVIZUTO et al., 2010;

RAMALHO-FERREIRA, 2014, RAMALHO-FERREIRA et al., 2015). Pode-se afirmar que o GRLX teve rápida ativação proteica em relação ao GCRT, devido a imunomarcação do GRLX ter sido moderada dos anticorpos OC, RANKL e COL-1 no período de 15 dias, e do GCRT imunomarcação leve. O que dá créditos a ação do raloxifeno em capacidade neoformadora.

No entanto, durante os períodos abordados na análise de imunistoquímica é possível afirmar que o GCRT teve maior formação de tecido mineralizado em relação ao GRLX, em razão da imunomarcação do anticorpo OC, que é a principal proteína não colagenosa da matriz extracelular do tecido ósseo que caracteriza seu estado de mineralização e seu estágio de maturidade (FAVERANI et al., 2018), que no GRLX, apontou uma regressão do processo de mineralização, concordando com a análise histológica e histométrica para os valores de AON aos 40.

Além disso, de acordo com a literatura, partindo do enfoque comparativo entre OPG e RANKL, há evidência de que quando há o predomínio da imunomarcação do anticorpo OPG a resposta tecidual tende para formação óssea e quando há o predomínio de RANKL tende para resposta de reabsorção óssea. Já quando não há predominância, na imunomarcação, entre os anticorpos OPG e RANKL, pode-se afirmar que o grupo alcançou o equilíbrio de remodelação óssea (YOGUI et al. 2013; RAMALHO-FERREIRA, 2014 e FAVERANI et al., 2018). Diante estes critérios de avaliação pode-se deduzir que o GRLX alcançou o equilíbrio na taxa de remodelação óssea nos períodos de 30 e 40 dias, ao contrário do GCRT, que teve destaque na imunomarcação dos anticorpos OPG, indicando que houve maior neoformação óssea, o que reforça a diferença estatística da análise de AON entre os grupos ao 40 dias.

O GRLX apresentou-se equivalente ao GCRT, aos 40 dias, na análise de ELCOI, indicando que no quesito corticalização de superfície ambos tiveram comportamento equivalente, no entanto, em geral, o GRLX ainda não alcançou o seu platô de neoformação óssea, como foi evidenciado pelo GCRT. As imunomarcações do GRLX de RANKL e OPG apresentaram-se leve, indicando que se alcançou o turnover ósseo (YOGUI et al. 2013), além disso o aumento da imunomarcação do COL-1 contribui na mediação da cascata de sinal para a expressão de osteoblastos maduros e para a mineralização da matriz extracelular (SAINO et al., 2011), que foi observado ao longo dos períodos estudados na análise de imunistoquímica do

GRLX, mantendo moderado aos 15 e 30 dias e de leve a moderado aos 40 dias. Sendo assim, este resultado indica que a formação óssea ocorrerá em tempos mais tardios, alcançado a sua maturação óssea a longo prazo (HUPP R.J.; ELLIS-III E.; e TUCKER M.R. 2009).

Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o estudo abre viés para novas análises, para de fato, evidenciar se a longo prazo haverá divergências entre os grupos estudados. Visto que é preciso avaliar mudanças dinâmicas na remodelação óssea ao redor da superfície do implante de forma mais clara e precisa, trazendo assim, uma visão mais completa integrando as análises já realizadas, além de reiterar com a literatura.

8 CONCLUSÃO

Com isso, é possível concluir que o raloxifeno, utilizado para modificação da superfície do implante, apresentou características de neoformação óssea ao redor do implante, porém com a quantidade formada sendo semelhante ao grupo controle. Isso mostra que existe a necessidade de outros estudos para entendermos com mais precisão o mecanismo de ação do raloxifeno e sua aplicação local.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T.; Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 1: 233–238, 1990.
- APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L.; SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Influência dos íons K⁺ e Mg²⁺ na obtenção de apatitas biomiméticas. **Eclética Química** 30: 13–18, 2005.
- APOSTU, D.; LUCACIU, O.; LUCACIU, G. D. O.; CRISAN, B.; CRISAN, L.; BACIUT, C.; ONISOR, F.; BACIUT, C.; CÂMPIAN, R. S; BRAN, S. Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. **Drug Metabol. Rev.**, v. 49, n. 1, p. 92–104, 2017.
- CLEMETT, D.; SPENCER, C. M. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 379-411, 2012.
- SILVA, A. C. **Materiais híbridos de biovidro e raloxifeno para reparo alveolar**. 2018 58 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2018.
- DELMAS, P. D.; ENSRUD, K. E.; ADACHI HARPER, K. D.; SARKAR, S.; GENNARI, C.; REGINSTER, J. Y.; POLS, H. A.; RECKER, R. R.; HARRIS, S. T.; WU, W.; GENANT, H. K.; BLACK, D. M.; EASTELL, R. Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 8, p. 3609- 3617, 2002.
- ERIKSEN, E. F. Effects of anticatabolic and anabolic therapies on the tissue level. **Clin. Rev. Bone Miner. Metabol.**, v. 4, n. 3, p. 177-196, 2006.
- 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. O raloxifeno, mas não o alendronato, pode compensar a osseointegração prejudicada em ratos osteoporóticos. **Clin. Oral Invest.**, v. 22, p. 255-265, 2018.
- GALEA, G. L.; PRICE, J. S.; LANYON, L. E. Estrogen receptors' roles in the control of mechanically adaptive bone (re)modeling. **J. Bonekey Reports**, v. 4, n. 2, p. 413, 2013.
- GRADY, D.; CAULEY, J. A.; STOCK, J. L.; COX, D. A.; MITLAK, B. H.; SONG, J.; CUMMINGS, S. R. Effect of raloxifene on all-cause mortality. **Am. J. Med.**, v. 123, n. 5, p. 469.e1-469.e7, 2010.
- HARMANKAYA, N.; KARLSSON, J.; PALMQUIST, A.; HALVARSSON, M.; IGAWA, K.; ANDERSSON, M.; TENGVALL, P. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. **J. Acta Biomater.**, v. 9, n. 6, p. 7064-7073, 2013.

HOCHNER-CELNIKIER, D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 85, n. 1, p. 23-29, 1999.

HUPP, R.J.; ELLIS-III, E.; TUCKER, M.R. **Cirurgia Oral Maxilofacial Contemporânea**. 5^o Edição. In: Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, cap. Parte I, p. 50-52, 2009.

LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **J. Dent. Mater.**, v. 23, n. 7, p. 844-854, 2007.

LUVIZUTO, E. R.; QUEIROZ, T. P.; DIAS, S. M.; OKAMOTO, T.; DORNELLES, R. C.; GARCIA-JÚNIOR, I. R.; OKAMOTO, R. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. **Arch. Oral Biol.**, v. 55, n. 1, p. 52-59, 2010.

MAZZO, C. R.; REIS, A. C.; SHIMANO, A. C.; VALENTE, M. L. In vitro analysis of the influence of surface treatment of dental implants on primary stability. **Braz. Oral Res.** v. 26, n. 4, p. 313-317, 2012.

MOEN, M. D.; KEATING, G. M. Raloxifene: a review of its use in the prevention of Invasive breast cancer. **Drugs**, v. 68, n. 14, p. 2059-2083, 2008.

QUEIROZ, T. P.; SOUZA, F. Á.; GUASTALDI, A. C.; MARGONAR, R.; GARCIA-JÚNIOR, I. R.; HOCHILI-VIEIRA, E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and Topographical Analysis in Rabbits. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 24, n. 8, p. 896-903, 2013.

RAMALHO-FERREIRA, G. **Avaliação do reparo ósseo/implante em ratas com osteoporose induzida tratadas com raloxifeno ou alendronato: análise histométrica, imunoistoquímica, por epifluorescência e biomecânica**. 2014. 122 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, 2014.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L. P.; PRADO, F. B.; GARCIA-JÚNIOR, I. R.; OKAMOTO, R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, n. 6, p. 798-805, 2015.

REY, J. R. C.; CERVINO, E. V.; RENTERO, M. L.; CRESPO, E. C.; ALVARO, A. O.; CASILLAS, M. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. **Open Orthop. J.**, v. 3, p.14-21, 2009.

SAINO, E.; GRANDI, E.; QUARTARONE, V.; MALIARDI, V.; GALLI, D.; BLOISE, N.; FASSINA, L.; ANGELIS, M. G. C.; MUSTARELLI, P.; IMBRIANI, M.; VISAI, L. In vitro calcified matrix deposition by human osteoblasts onto a zinc-containing bioactive glass. **Eur. Cell. Mater.**, v. 21, p. 59-72, 2011.

YANG, N.N.; VENOGOPALAN, M.; HARDIKAR, S.; GLASEBROOK, A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. **Science** **1996**; v. 273, p.1222-6, 1996.

YOGUI, F.C.; OLIVEIRA, D.; RAMALHO FERREIRA, G.; FAVERANI, L.P.; LUVIZUTO, E.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Efeito dos SERMs sobre o metabolismo ósseo durante o processo de reparo alveolar em ratas osteoporóticas. In: 3.º Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Anais: **Arch Health Invest** **2013**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-Campos de Araçatuba-UNESP/FOA. 2013; p.78.

YOUNIS, I.; GAULT, D.; SABBAGH, W.; KANG, N. V. Patient satisfaction and aesthetic outcomes after ear reconstruction with a branemark-type, bone-anchored, ear prosthesis: a 16-year review. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 63, n. 10, p. 1650-1655, 2010.

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 Projeto de Pesquisa intitulado "Análise biomecânica, topográfica, histométrica e imunoistoquímica da resposta óssea de uma superfície de implante revestida com raloxifeno", Processo FOA nº 2015-00612, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Dezembro de 2016.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Janeiro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Biochemical, topography, histometric and immunochemistry analysis of the bone response on implant surface treatment with raloxifene", Protocol FOA nº 2015-00612, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 13, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 13, 2017.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

