

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

LAURA GABRIELA MACEDO

**Reconstruções Ósseas com diferentes formulações do Cerabone®
associado ao Raloxifeno pela Rota Sonoquímica: caracterização
histológica e imunoistoquímica em calvária de ratos**

Araçatuba – SP

2024

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

**Reconstruções Ósseas com diferentes formulações do
Cerabone® associado ao Raloxifeno pela Rota
Sonoquímica: caracterização histológica e
imunoistoquímica em calvária de ratos**

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

Orientador: Professora Doutora Roberta
Okamoto

Araçatuba – SP

2024

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cuidar de mim em cada momento da minha vida.

Aos meus pais, Laércio e Sidnéia, por apoiarem meus sonhos e não medirem esforços para que se tornassem realidade.

Às minhas irmãs, Thais e Jaqueline, por, assim como meus pais, participarem da minha criação e sempre me ajudarem com o que fosse preciso

. Ao meu sobrinho, João Pedro, por ter chegado no meu primeiro ano de faculdade e ter tornado esse processo mais leve e feliz.

Ao meu namorado, Gabriel, por sempre estar do meu lado e disposto a qualquer coisa para me fazer feliz.

A cada um de meus amigos, por terem vivido esses anos comigo e se tornarem uma segunda família, me proporcionando tantos momentos felizes e acolhimento que guardarei para sempre, obrigada por dividirem a graduação comigo e torná-la muito melhor.

À minha orientadora, Roberta Okamoto, por ter me acolhido na iniciação científica e me apresentado a pesquisa na universidade, me oferecendo uma gama de oportunidades, aprendizado e crescimento com a sua excelente orientação.

À equipe do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados, por toda a participação na execução do meu projeto de pesquisa, sempre com muita dedicação e carinho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2021/12852-8, por fomentar 2 anos de execução do meu projeto, me permitindo realizar análises e obter resultados que contribuirão para o avanço da ciência e tecnologia da odontologia brasileira.

RESUMO

MACEDO, LG. **Reconstruções Ósseas com diferentes formulações do Cerabone® associado ao Raloxifeno pela Rota Sonoquímica: caracterização histológica e imunoistoquímica em calvária de ratos.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2024.

O uso de substitutos ósseos é amplamente consolidado em perdas ósseas. Através da funcionalização é possível promover a melhora destes substitutos, a partir da introdução de moléculas bioativas que atuam diretamente nas células ósseas, desencadeando respostas favoráveis ao processo de reparo tecidual. Bons resultados nesse reparo têm sido encontrados com a incorporação do raloxifeno a biomateriais, utilizando o processo da sonicação. O objetivo deste projeto foi avaliar, por meio de análise histomorfométrica, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada, uma alteração de superfície, através da homogeneização e funcionalização promovida no Biomaterial Cerabone® combinado ao Raloxifeno através do método de sonicação química, em calvárias de ratos. Para tal, 96 ratos machos tiveram um defeito ósseo induzido na calvária, onde o biomaterial foi utilizado como enxerto. Os animais foram divididos aleatoriamente em 06 grupos (n=16), de acordo com o material de enxerto, Grupo 01 (Coágulo), Grupo 02 (Cerabone®), Grupo 03 (Cerabone® sonicado), Grupo 04 (Cerabone® e Raloxifeno sonicados), Grupo 05 (Cerabone® e veículo gel), Grupo 06 (Cerabone® e gel Raloxifeno). Após um período de 14 e 28 dias pós-cirúrgicos foi realizada a eutanásia dos animais para a remoção dos espécimes, que foram processados e submetidos à análise de microtomografia computadorizada e análise histológica. Os dados obtidos foram submetidos a curva de normalidade para determinação do teste estatístico adequado no software GraphPad Prism 7.03, com adoção do nível de significância $P < 0,05$. Os resultados mostraram que Cerabone® Sonicado e o Cerabone® associado ao veículo gel mostraram desempenho superior quando comparado com o grupo em que foi utilizado apenas coágulo ou Cerabone® puro para a regeneração óssea.

Palavras-chave: biomaterial; regeneração óssea; substitutos ósseos; ultrassom.

ABSTRACT

MACEDO, LG. **Bone Reconstructions with different formulations of Cerabone® associated with Raloxifene via the Sonochemical Route: histological and immunohistochemical characterization in rat calvaria.** 2024. Undergraduate Thesis – Faculty of Dentistry, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2024.

The use of bone substitutes is largely consolidated in bone loss. Through functionalization, it is possible to promote the improvement of these substitutes, from the introduction of bioactive molecules that act directly on bone cells, triggering favorable responses to the tissue repair process. Good results in this repair have been found with the incorporation of raloxifene to biomaterials, using the sonication process. The objective of this project was to evaluate, through histomorphometric, immunohistochemical and computerized microtomography analysis, a surface alteration, through the homogenization and functionalization promoted in the Biomaterial Cerabone® combined with Raloxifene through the method of chemical sonication, in rat calvaries. For this, 96 male rats had a bone defect induced in the calvaria, where the biomaterial was used as a graft. The animals were randomly divided into 06 groups (n=16), according to the graft material, Group 01 (Clot), Group 02 (Cerabone®), Group 03 (Cerabone® sonicated), Group 04 (Cerabone® and Raloxifene sonicated), Group 05 (Cerabone® and gel vehicle), Group 06 (Cerabone® and Raloxifene gel). After a period of 14 and 28 days after surgery, the animals were euthanized to remove the specimens, which were processed and submitted to computerized microtomography and histological analysis. The data obtained was submitted to a normality curve to determine the appropriate statistical test in the GraphPad Prism 7.03 software, with the adoption of the significance level $P < 0.05$. Results showed that Cerabone® sonicated and Cerabone® associated with the gel vehicle showed superior performance when compared with the group in which only clot or pure Cerabone® was used for bone regeneration.

Keywords: Biocompatible Materials; Bone Regeneration; Bone Substitutes; Ultrasonic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de sonicação do Cerabone® puro (Grupo CBS).	17
Figura 2 - Processo de sonicação do Cerabone® + Raloxifeno (Grupo CBRS).	17
Figura 3 - Processo de cavitação.	18
FIGURA 4 - Colapso da bolha de cavitação	18
Figura 5 - (A) Tricotomia em calvária. (B) Assepsia com PVPI. (C) Fresagem para criação do defeito ósseo. (D) Defeito ósseo com 5 mm de diâmetro. (E) Acomodação do biomaterial. (F) Reposicionamento dos tecidos e sutura. Figura 6 - Imagens obtidas pelo software CTVox, representando a reconstrução realizada pelo escaneamento microtomográfico.	19
Figura 6: Imagens obtidas pelo software CTVox, representando a reconstrução realizada pelo escaneamento microtomográfico.	31
Figura 7 - Análise histológica dos grupos experimentais aos 14 dias.	32
Figura 8 - Análise histológica dos grupos experimentais aos 28 dias.	33
Figura 9 - Imunomarcção de PECAM (VEGF) para os grupos experimentais.	37
Figura 10 - Imunomarcção de RUNX-2 para os grupos experimentais.	38
Figura 11 - Imunomarcção de OPN para os grupos experimentais.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação do número de amostras de cada grupo experimental utilizadas nas análises de imunoistoquímica, histometria e microtomografia computadorizada.	24
Tabela 2: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro BV/TV.	26
Tabela 3: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.Th.	27
Tabela 4: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.N.	28
Tabela 5: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.Sp.	29
Tabela 6: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro IS.	30
Tabela 7: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para a quantidade de tecido ósseo.	35
Tabela 8: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o remanescente de biomaterial.	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Valores obtidos para o parâmetro Porcentagem de Volume Ósseo por meio da microtomografia computadorizada.	26
Gráfico 2: Valores obtidos para o parâmetro Espessura Trabecular por meio da microtomografia computadorizada.	27
Gráfico 3: Valores obtidos para o parâmetro Número de Trabéculas por meio da microtomografia computadorizada.	28
Gráfico 4: Valores obtidos para o parâmetro Separação de Trabéculas por meio da microtomografia computadorizada.	29
Gráfico 5: Valores obtidos para o parâmetro Superfície de Intersecção por meio da microtomografia computadorizada.	30
Gráfico 6: Percentual de tecido ósseo encontrado nas lâminas histológicas, por meio da análise histométrica.	35
Gráfico 7: Percentual de biomaterial remanescente no tecido encontrado nas lâminas histológicas, por meio da análise histométrica.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μM	Micrômetro
<	Menor
BV/TV	Volume Ósseo
CB	Cerabone
CBG	Cerabone Gel
CBRG	Cerabone e Raloxifeno Gel
CBRS	Cerabone e Raloxifeno Sonicados
CBS	Cerabone Sonicado
COAG	Coágulo
G	Gramas
HE	Hematoxilina e Eosina
IS	Superfície de Intersecção
MICRO-CT	Microtomografia Computadorizada
MM	Milímetro
OPN	Osteopontina
RUN-X2	Fator de Transcrição Chave Associado à Diferenciação de Osteoblastos
TB.N	Número de Trabéculas
TB.SP	Separação de Trabéculas
TB.TH	Espessura Trabecular
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Modelo experimental	15
3.2 Preparação e Caracterização do Biomaterial (Cerabone® Sonicado)	15
3.3 Procedimento cirúrgico	18
3.4 Processamento das amostras calcificadas	19
3.5 Processamento das amostras descalcificadas	21
3.6 Análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT)	21
3.7 Análise histológica	22
3.8 Análise Histométrica	22
3.9 Análise imunoistoquímica	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	25
4.2 Análise Histológica	31
4.2.1 Grupo Coágulo (COAG)	32
4.2.2 Grupo Cerabone (CB)	33
4.2.3 Grupo Cerabone Gel (CBG)	33
4.2.4 Grupo Cerabone Raloxifeno Gel (CBRG)	33
4.2.5 Grupo Cerabone Sonicado (CRB S)	33
4.2.6 Grupo Cerabone Raloxifeno Sonicado (CRB R S)	34
4.3 Análise Histométrica	34
4.4 Imunoistoquímica	37

5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A perda dentária está associada a uma saúde bucal precária, sendo capaz de causar impactos fisiológicos, sociais e psicológicos (1). Fisiologicamente, ocorre uma severa reabsorção do osso alveolar pós-extração, principalmente na região posterior da maxila onde há a diminuição da altura compreendida entre o assoalho maxilar e a crista alveolar (2, 3, 4), o que torna a reabilitação oral, através de implantes dentários nesta região complexa (5).

As reabilitações orais através da terapia com implantes necessitam da disponibilidade de volume ósseo suficiente além da qualidade deste no rebordo remanescente (2, 6). Dessa maneira, um aumento ósseo vertical prévio pode ser requerido, sendo para tanto utilizadas inúmeras técnicas e substitutos ósseos (7).

O enxerto ósseo de origem autógena é considerado o biomaterial mais apropriado quando há a necessidade de restauração da arquitetura óssea devido a preservação das células e proteínas osteogênicas (8, 9,10,11). Todavia, a obtenção do enxerto ósseo autógeno pode trazer ao paciente morbidades, como lesões nervosas, além do aumento do tempo cirúrgico, uma vez que há a necessidade de um segundo sítio, aumento dos custos, dor e reabsorção imprevisível deste enxerto (12, 13). O uso deste tipo de enxerto é condicionado a disponibilidade do tecido em termos de qualidade e quantidade óssea da área doadora (9), assim, o paciente pode não possuir um sítio doador com a quantidade demandada pela área destinatária, ou, as condições médicas do paciente podem influenciar a qualidade óssea, o que pode tornar a utilização deste tipo de enxerto com menor aproveitamento (14, 15).

Nesse contexto, uma grande variedade de biomateriais tem sido desenvolvida, como os xenoenxertos, os enxertos alógenos e os materiais aloplásticos (14, 15). O uso dos enxertos ou substitutos ósseos vai além das perdas ósseas provocadas por extrações dentais. Eles podem ser utilizados para tratamentos de defeitos provocados por tumores ósseos, trauma, pseudo-artrose e doenças destrutivas das articulações, inclusive em outras localizações que não a face (13, 16, 17).

Um dos biomateriais mais aplicados como substituto ósseo é o Bio-Oss®, um enxerto ósseo bovino desmineralizado (18), cuja utilização é amplamente consolidada, com resultados clínicos exitosos mencionados na literatura (19, 20, 21, 22). Uma eficácia de cerca de 80-100% foi apontada quando este material era empregado, dessa forma, sugeriu-se uma eficácia semelhante ao osso autógeno, o que faz com que seja considerado como promissor em comparação aos demais de sua categoria (23, 24). Entretanto, tal material apresenta custo elevado se comparado aos demais de sua categoria, exigindo que novas tecnologias e

materiais sejam aprimoradas com o propósito de induzir ao máximo o desenvolvimento de tecido ósseo através da angiogênese e osteogênese, com um custo reduzido (25,18,26).

Sabe-se que o Cerabone® é um biomaterial formulado a partir da fase mineral do osso bovino (27), com propriedades como a morfologia de superfície, porosidade e composição similares ao osso humano (28). Há bons resultados com o uso deste biomaterial para fins de enxertia óssea associada a reabilitação oral (27, 29). Ainda, possui lenta degradação, acelerada integração ao sítio receptor, ausência de reação inflamatória, adesão e absorção de sangue, além da facilidade de manipulação (30). Junto a estas propriedades, considera-se que a adição de moléculas bioativas, como o modulador seletivo de receptor de estrógeno, atuando diretamente em osteoblastos do leito receptor, pode desencadear melhores respostas biológicas, o que pode resultar numa melhora do tecido ósseo reparacional. Promovendo um efeito a nível celular, ainda maior, através da osteocondução (27, 28).

Uma possibilidade que tem sido explorada recentemente, consiste na melhora das propriedades destes biomateriais, através da funcionalização de suas superfícies, com moléculas bioativas que atuam diretamente nas células do tecido ósseo, desencadeando respostas favoráveis ao processo de reparo tecidual (27). Para tanto foi demonstrado a viabilidade da utilização do processo de sonicação através do ultra-som, na qual é possível promover a síntese de materiais nanoestruturados, homogeneizando duas ou mais substâncias, por meio de ondas ultrassônicas, promovendo modificações químicas e físicas (28, 29, 30, 31, 32).

A sonicação química, é considerado um método ecologicamente correto, econômico e simples, capaz de prover a elaboração de nanopartículas com características incomuns, em comparação com outros processos de síntese de matérias e/ou substâncias (33).

Resultados favoráveis têm atestado a efetividade da associação de um modulador seletivo de receptores de estrogênio, o Raloxifeno, a materiais de enxertia óssea com o objetivo de melhorar a neoformação óssea através da osteocondução (38), utilizando a técnica da sonicação a ser utilizada no presente trabalho (27, 34).

Desde que os princípios de enxertia foram determinados, o uso desses biomateriais vem crescendo consideravelmente (35). Estima-se que cerca de 2,2 milhões de cirurgias com o uso de substitutos ósseos sejam feitos por ano no mundo, movimentando cerca de 2,5 bilhões de dólares (36). Ainda, prevê-se que este mercado venha a mobilizar cerca de 922,6 milhões em 2024 (37). Dessa forma, constituindo um mercado atrativo do ponto de vista financeiro.

Assim, diante do exposto, torna-se interessante viabilizar e investigar a funcionalização de um biomaterial com características superiores aos disponíveis no mercado, com um custo reduzido, por meio da associação entre o Raloxifeno e o Cerabone® utilizando a técnica da sonicação. Dessa forma contribuindo para o aprimoramento deste biomaterial. Ademais a técnica da sonicação tem sido apontada como capaz de promover síntese de substâncias, além de, melhoras significativas das características de biomateriais e medicamentos, assim, espera-se, da mesma forma, estudar mais a fundo a utilização desta técnica (38, 30, 31,32). Posto que a movimentação de valor financeiro deste tipo de biomaterial é considerada alta, julga-se ainda mais atrativo o seu aprimoramento. Por fim, espera-se promover o barateamento dos custos das reabilitações orais que demandam enxertia óssea, permitindo que esses procedimentos sejam realizados em maior número pelo Sistema único de Saúde (SUS).

2 OBJETIVOS

Avaliar, por meio de análise histomorfométrica, imunoistoquímica, e microtomografia computadorizada (Micro-CT), uma alteração de superfície, através da homogeneização e funcionalização promovida no Biomaterial Cerabone® combinado ao Raloxifeno através do método de sonicação química, em calvárias de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Este estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Araçatuba, SP, Brasil, sob o processo 0811-2019 e será realizado de acordo com as diretrizes ARRIVE para pesquisa animal, propostas por Kilkenny (37). Noventa e seis ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), pesando de 300 a 400 g, em idade adulta, com no máximo 6 meses, foram selecionados e divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais. Foram distribuídos 16 animais por grupo experimental, sendo metade destes destinados ao período 14 dias pós-operatórios e a outra metade, destinada ao período de 28 dias pós-operatórios.

- **Grupo coágulo (COAG)**
- **Cerabone (CB)**
- **Cerabone sonicado (CBS)**
- **Cerabone + Raloxifeno sonicado (CBRS)**
- **Cerabone + veículo gel (CBG)**
- **Cerabone + gel Raloxifeno (CBRG)**

3.2 Preparação e Caracterização do Biomaterial (Cerabone® Sonicado)

O protocolo empregado para a preparação e caracterização do Biomaterial (Cerabone® Sonicado) será o estabelecido por Gomes-Ferreira & Lisboa-Filho (39) a ser realizado no Laboratório de Materiais Avançados do Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP-Bauru (Responsável: professor Paulo Noronha Lisboa-Filho).

Para preparação do biomaterial, o Cerabone® puro (Grupo 3) (Figura 1) e o Cerabone® associado a 20% de Raloxifeno (Grupo 4), passarão por um processo de sonicação.

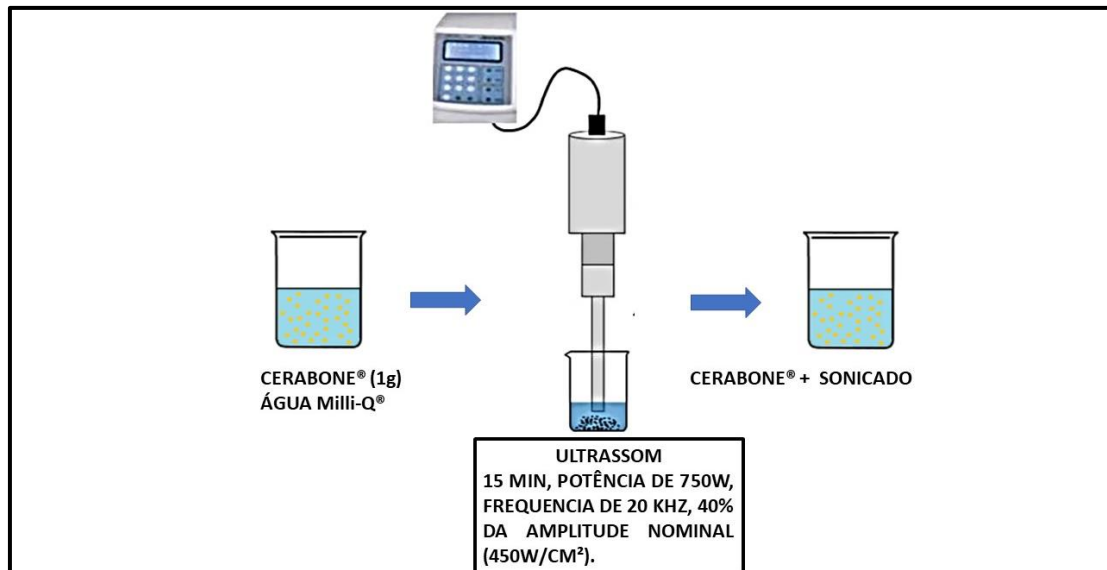
A proporção do Raloxifeno definida como sendo 20% foi estabelecida segundo o estudo realizado por Lisboa-Filho (27). Dessa forma, a cada 0,8 g de Cerabone®, 0,2g de Raloxifeno na sua forma sólida (Figura 2), em que será promovida a homogeneização ou incorporação do raloxifeno ao biomaterial Cerabone®.

A sonicação é realizada utilizando-se o aparelho Sonics® VCX-750 (Sonics&Materials, Inc., EUA), por cerca de 15 minutos (40). Os parâmetros de sonicação adotados são: potência de 750 W; frequência de 20 kHz; e 40% da amplitude nominal do equipamento (450W / cm²). Para se obter um sistema homogêneo e ter o tamanho das partículas reduzidos será utilizada

a água ultrapura Milli-Q® (Millipore, EUA). A água Milli-Q® ultrapura faz com que as bolhas de cavitação tenham maior vapor de soluto e, assim, acelere o efeito da cavitação acústica. De maneira que a técnica da sonicação consiste na conversão de voltagem elétrica em ondas sonoras, por meio de um aparelho ultrassom. Estas ondas sonoras causam vibrações mecânicas que são transferidas para o meio líquido formando bolhas/microbolhas, que entram em colapso, processo este denominado de cavitação acústica (41). Será utilizado durante este processo um Ultrassom de ponteira que oscila a uma frequência fixa e potencial variável. A oscilação rápida desta ponteira produz um campo de alta energia no fluído. No solvente dentro desse campo acontece um processo de ebulição e colapso de bolhas (42). As vibrações dessa ponteira, em associação ao colapso das bolhas, são capazes de provocar a incorporação de substâncias bioativas a materiais. Quando o ultrassom é aplicado a um sistema sólido-líquido, devido à proximidade da superfície sólida, o colapso entre as bolhas ocorre de forma assimétrica, há uma entrada de fluido da bolha para a superfície sólida, a este fenômeno dá-se o nome de microstreaming (microjatos), ou seja, há uma penetração das bolhas formadas na matriz sólida (43) (Figuras 3 e 4). A água ultrapura Milli-Q® utilizada nesse experimento funciona como um solvente para os solutos (Cerabone® + Raloxifeno, e Cerabone® puro). Dessa maneira, espera-se que a sonicação contribua para a incorporação do Raloxifeno ao Cerabone®, visto que o ultrassom gera ondas sonoras capazes de provocar este efeito de cavitação, permitindo a penetração do Raloxifeno ao Cerabone®. Quanto ao Cerabone® puro sonicado haverá modificação em sua estrutura dado este processo de cavitação ou colapso das bolhas formadas contra a superfície deste.

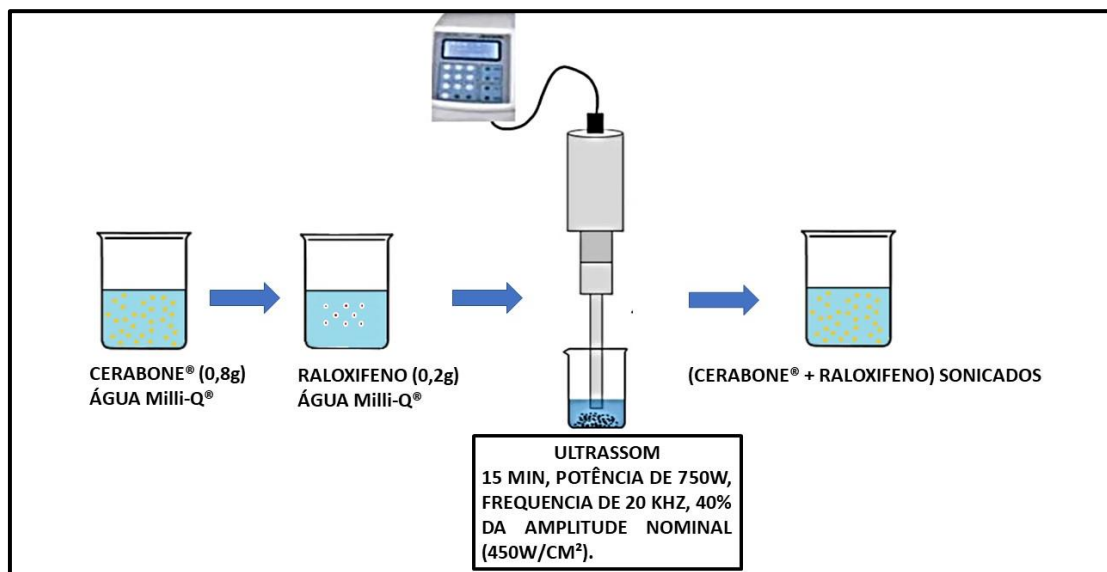
Uma vez realizado este processamento, as amostras serão deixadas para secar a 60 °C por um período de 8 horas. Será realizado um processo de esterilização por meio de ultravioleta (UV).

Figura 1: Processo de sonicação do Cerabone® puro (Grupo CBS).



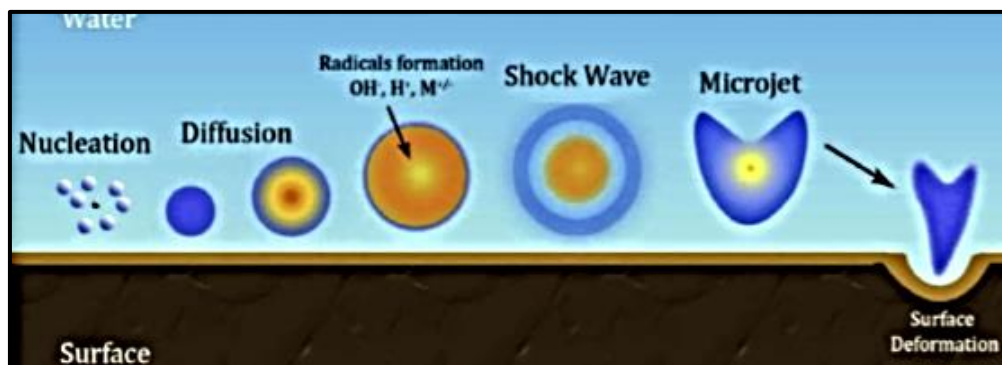
Fonte: Siqueira, NB. 2021

Figura 2: Processo de sonicação do Cerabone® + Raloxifeno (CBRS).



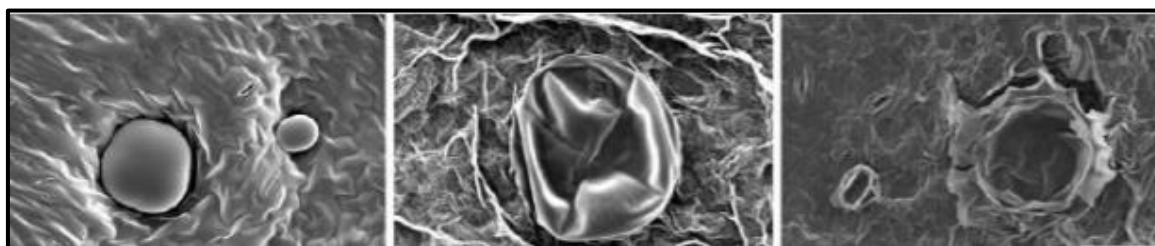
Fonte: Siqueira, NB. 2021

Figura 3: Processo de cavitação



Fonte: Adaptado de POKHREL *et al.* 2016

FIGURA 4 – Colapso da bolha de cavitação



Fonte: Adaptado de CHEMAT *et al.* 2011

3.3 Procedimento cirúrgico

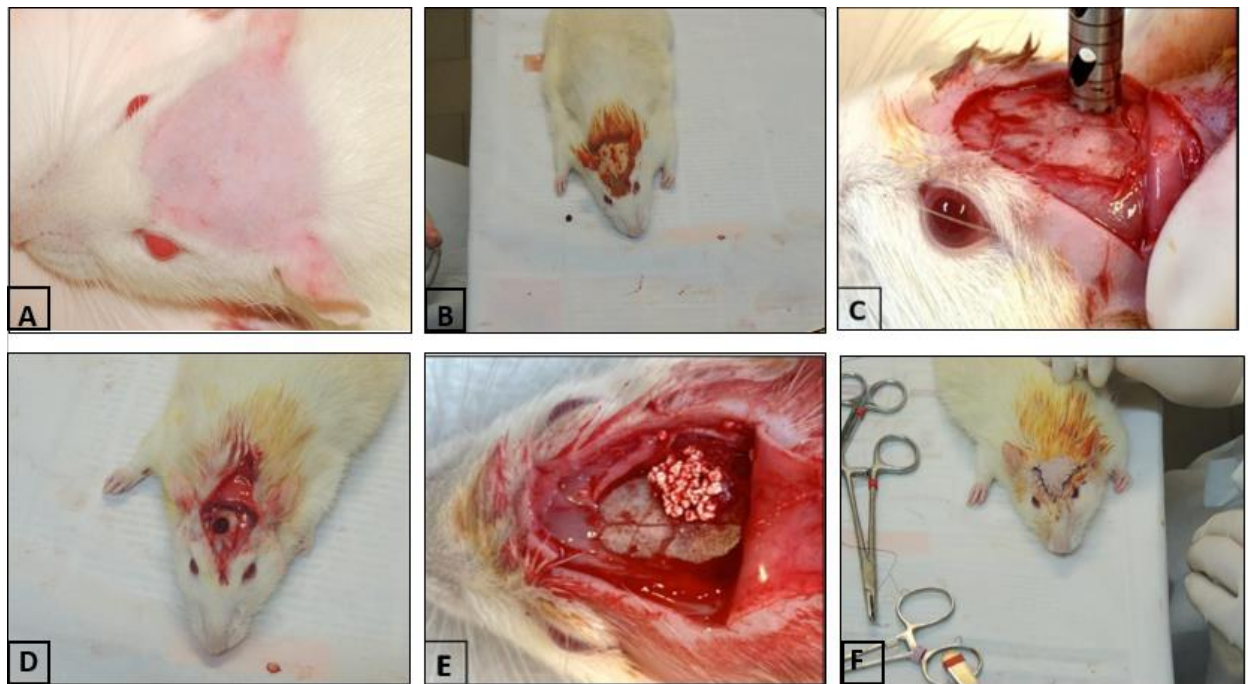
No mês de janeiro de 2022, 96 ratos foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba– UNESP e trazidos para o Biotério do Departamento de Ciências Básicas, os quais ficaram por 15 dias para ambientalização, sendo alimentados com ração e água *ad libitum*. A partir disso, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Francotar – Virbac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 70mg/Kg e 6mg/Kg, respectivamente. Foi realizada a tricotomia na região da calvária, antisepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine 10 Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão semilunar no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo debisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com

descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 5mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 5 mm de diâmetro, no osso parietal, mantendo-se a integridade da dura-máter.

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados esuturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

Figura 5: (A) Tricotomia em calvária. (B) Assepsia com PVPI. (C) Fresagem para criação do defeito ósseo. (D) Defeito ósseo com 5 mm de diâmetro. (E) Acomodação do biomaterial. (F) Reposicionamento dos tecidos e sutura.



Fonte: LSMT.

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 **"Avaliação da funcionalização do Cerabone® associado ao Raloxifeno no reparo ósseo através da sonicação: um estudo experimental em ratas"**, Processo FOA nº 0811-2019, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 09 de Setembro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Outubro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the functionalization of Cerabone® associated with Raloxifene in bone repair through the sonochemical method: an experimental study in rats"**, Protocol FOA nº 0811-2019, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 09, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 09, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

3.4 Processamento das amostras calcificadas

As partes do crânio foram removidas e divididas ao meio, sendo então fixadas em solução de formalina 10% por 48 horas. Na sequência, as amostras de 28 dias foram lavadas em água corrente por 24 horas e posteriormente foram mantidas em álcool 70 para a realização da análise microtomográfica.

3.5 Processamento das amostras descalcificadas

As partes do crânio foram removidas e divididas ao meio, sendo então fixadas em solução de formalina 10% por 48 horas. As amostras de 14 dias foram desmineralizadas em EDTA 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e desidratadas com a aplicação de uma série de alcoóis, assim como as amostras de 28 dias após a realização da análise microtomográfica. Após essas etapas, foram colocadas em xilol, incluídas em parafina e cortadas paralelamente à sutura sagital com 5µm de espessura, sendo coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Merck & Co., Inc.), para análise histológica e análise histométrica, ou preparadas para análise imunoistoquímica.

3.6 Análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT)

As amostras de 28 dias pós operatórios, armazenadas em álcool 70 foram escaneadas em um microtomógrafo (SkyScan – Kontich, Belgium) do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba na posição horizontal, mantendo a orientação ápico-coronal, conectados aos tubos do próprio dispositivo e cortados em uma espessura de 8,74 µm com um raio-x apresentando 50 kV e 500 µA de corrente seguindo as recomendações de Lisboa-Filho *et al.* (46). Foi utilizado um filtro de alumínio (0,5 mm) em um meio úmido. A captura das imagens ocorreu em uma câmera com tamanho de pixel de 12,45 µm, com fileira contagem de 2672 e uma contagem de colunas de 4000. Após, as imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (v1.6.9.8) (SkyScan – Kontich, Belgium) com um alisamento de 1, uma correção de artefato em anel de 3, correção de endurecimento do feixe de 5%, e uma variação de correção de imagem de 0,0 a 0,11. As análises foram desenvolvidas no software CTAnalyzer (CTAn) (v1.12.4.0) (SkyScan – Kontich, Belgium). Com isso, foram definidos a fração de volume ósseo (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número de trabéculas (Tb.N) e a separação das trabéculas (Tb.Sp), além da superfície

de intersecção (IS), conforme preconizado por Bouxsein *et al.* (47). Todas as análises e coleta de dados foram realizadas por um único pesquisador treinado com antecedência para este trabalho.

3.7 Análise histológica

As lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), com objetiva de 10x e 20x, acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystemsltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III. Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região de bordas (coto) e região central dos defeitos ósseos

3.8 Análise Histométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), com objetiva de 10x, acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystemsltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageJ (NIH -NationalInstituteof Health). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. 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. Na análise dos resultados, foi considerada a seguinte proporção de tecido ósseo: % de tecido ósseo = (área do tecido ósseo/área total) * 100; sendo que a área total é a soma de todos os tecidos considerados (tecido ósseo e tecido conjuntivo). Para a comparação entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foi realizado o teste ANOVA 2 fatores (Análise de Variância) por meio do Programa estatístico para pesquisa biológica, SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc). Os fatores considerados foram tempo (14 x 28 dias) e biomateriais (diferentes biomateriais funcionalizados ou não). Foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

3.9 Análise imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi feito no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Ciências Básicas da FOA – Araçatuba/UNESP. Foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6.0) a 60 °C em calor úmido por 20 minutos, bloqueio da biotina endógena com leite desnatados por 20 minutos, e ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%. Sobre os cortes selecionados, foram utilizados os anticorpos primários contra PECAM, RUNX- 2, Osteopontina (Santa Cruz Biotechnology) para caracterizar o fenótipo osteoblástico, bem como os diferentes estágios da diferenciação das células desta linhagem durante o processo de reparação óssea avaliados. O anticorpo secundário usado foi o biotinilado anti-cabra, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). O sinal foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC Standard, Vector Laboratories) e o cromógeno foi o Diaminobenzidina (Dako Laboratories). Ao término das reações, foi realizada a contra-coloração dos cortes com Hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas em xilol e lâminulas foram montadas para análise microscópica. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos. Para a análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland), conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise: duas para bordas e uma para o centro do defeito. Para cada um dos anticorpos a serem utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes escores de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de reparação óssea.

Tabela 1: Relação do número de amostras de cada grupo experimental utilizadas nas análises de imunoistoquímica, histometria e

microtomografia computadorizada.

Grupos experimentais	14 dias	28 dias
G1 Osso autógeno	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)
G2 Cerabone	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)
G3 Cerabone sonicado	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)
G4 Cerabone + raloxifeno sonicado	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)
G5 Cerabone + gel	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)
G6 Cerabone + gel de raloxifeno	Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)	Micro-CT (n=8) Imunoistoquímica/ Histometria (n=4)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

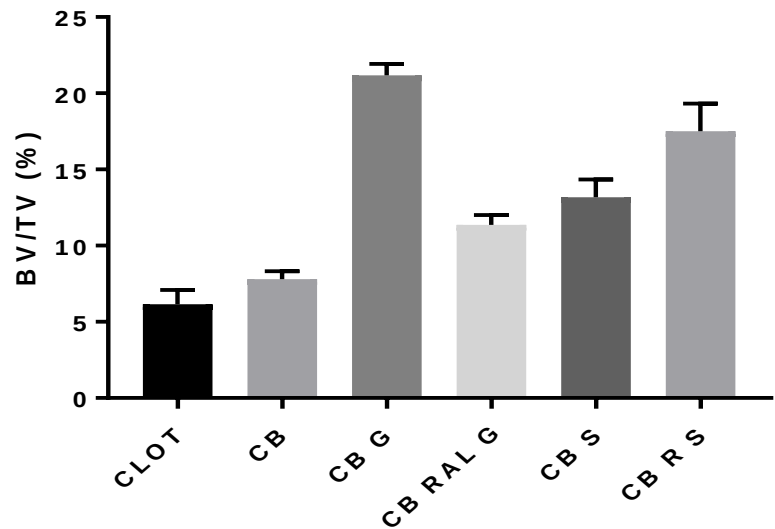
4 RESULTADOS

4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Neste trabalho estão apresentados os resultados referentes a uma amostra de cada grupo experimental, no entanto todos os animais foram submetidos à eutanásia e as respectivas amostras foram processadas. Nesta apresentação dos resultados, foi realizada a análise estatística onde houve comparação do grupo Cerabone com os demais grupos, exceto o grupo Coágulo, uma vez que o projeto visa avaliar o desempenho do biomaterial Cerabone manipulado em contrapartida à sua versão de fábrica. Foram avaliados os parâmetros Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV); Espessura Trabecular (Tb.Th); Número de Trabéculas (Tb.N); Separação de Trabéculas (Tb.Sp) e Superfície de Intersecção (IS).

Para o parâmetro Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV), o melhor resultado foi observado no grupo Cerabone Gel (CB G; 21.18%) e o pior resultado foi observado no grupo coágulo (COAG; 6.15%); seguido do grupo Cerabone puro (CB; 7.8%). A adição de raloxifeno no grupo Cerabone Raloxifeno Sonicado (CB R S; 17.51%) melhorou este parâmetro em comparação ao grupo Cerabone Sonicado (CB S; 13.18%). No caso do grupo Cerabone Raloxifeno Gel (CB R G; 11.36%) não foi observada melhora neste parâmetro em comparação ao grupo CB G. Houve diferença estatística entre o grupo CB e os demais grupos, exceto o COAG.

Gráfico 1: Valores obtidos para o parâmetro Porcentagem de Volume Ósseo por meio da microtomografia computadorizada.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

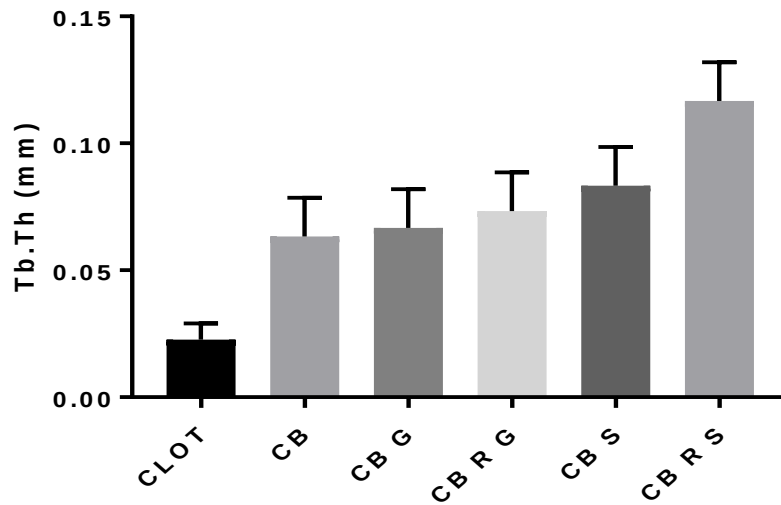
Tabela 2: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro BV/TV.

Grupo	Valor de p	Diferença estatística
CB e CBG	<0,0001	sim
CB e CBRG	0,0145	sim
CB e CBS	0,0005	sim
CB e CBRS	<0,0001	sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para o parâmetro Tb.Th, o grupo CB R S mostrou o melhor resultado (0.11µm) e o pior resultado foi observado no grupo coágulo (0.02µm). Os demais grupos experimentais mostraram resultados semelhantes, no entanto, é possível notar que a adição de raloxifeno mostrou discreta melhora no grupo CB R G. Houve diferença estatística entre o grupo CB e o grupo CB R S.

Gráfico 2: Valores obtidos para o parâmetro Espessura Trabecular por meio da microtomografia computadorizada.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 3: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.Th.

Grupo	Valor de p	Diferença estatística
CB e CBG	0,9997	não
CB e CBRG	0,9485	não
CB e CBS	0,5412	não
CB e CBR S	0,0062	sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para o parâmetro Tb.N, observou-se o melhor resultado no grupo CB G ($2.35\mu\text{m}$) e o pior resultado foi observado no grupo Clot ($0.4\mu\text{m}$). A adição de raloxifeno no grupo CB R S mostrou-se superior ao grupo CB S ($2.1\mu\text{m} \times 1.53\mu\text{m}$). Com exceção do grupo COAG, o grupo Cerabone foi inferior aos demais grupos experimentais testados neste

estudo quanto a este parâmetro. Houve diferença estatística entre os grupos CB e CB G, CB e CB R S.

Gráfico 3: Valores obtidos para o parâmetro Número de Trabéculas por meio da microtomografia computadorizada.

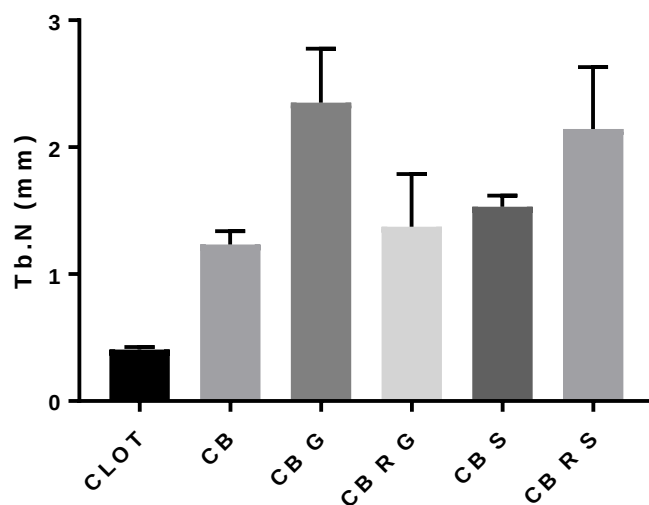


Tabela 4: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.N.

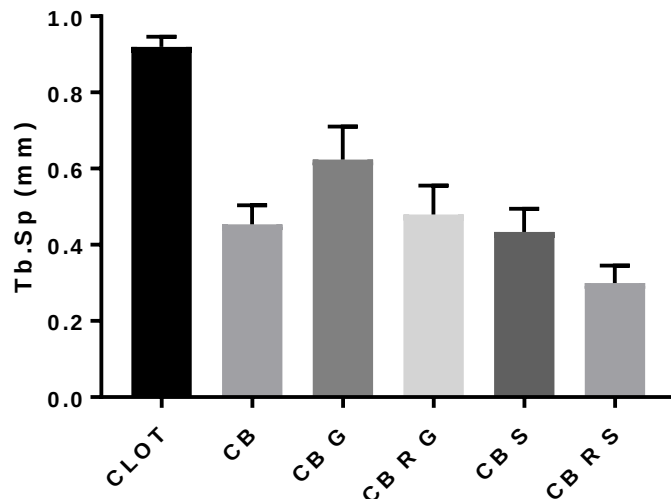
Grupo	Valor de p	Diferença estatística
CB e CBG	0,0105	sim
CB e CBRG	0,9934	não
CB e CBS	0,8566	não
CB e CBRS	0,0401	sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Quanto a separação trabecular (Tb.Sp), observou-se o maior valor para este parâmetro no grupo COAG (0.9 μ m) e o menor valor para este parâmetro no grupo CB R S (0.3 μ m). Vale destacar que todos os grupos onde o cerabone foi aplicado, seja

com raloxifeno na forma de gel ou sonicado, ou mesmo nos grupos veículos, o valor de separação entre as trabéculas foi bastante inferior ao grupo coágulo. Houve diferença estatística entre os grupos CB e CB G.

Gráfico 4: Valores obtidos para o parâmetro Separação de Trabéculas por meio da microtomografia computadorizada.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 5: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro Tb.Sp.

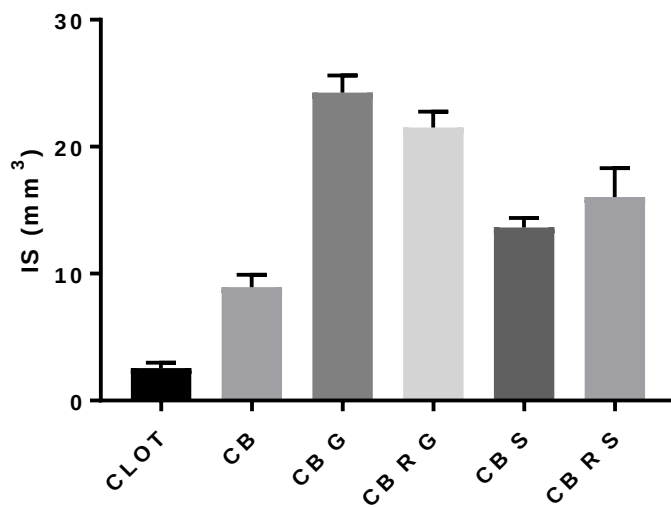
Grupo	Valor de p	Diferença estatística
CB e CBG	0,0461	sim
CB e CBRG	0,9935	não
CB e CBS	0,9983	não
CB e CBRS	0,0803	não

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para o parâmetro Superfície de Intersecção, o pior valor foi observado no grupo Clot (2.5 μ m) e os melhores valores nos grupos CB G e CB R G (24.26 μ m e 21.5 μ m). Vale destacar que tanto os grupos CB S como CB R S (13.6 μ m e 16.04 μ m) foram

superiores ao grupo CB ($8.9\mu\text{m}$). Houve diferença estatística entre o grupo CB e os demais grupos, exceto o grupo COAG.

Gráfico 5: Valores obtidos para o parâmetro Superfície de Intersecção por meio da microtomografia computadorizada.



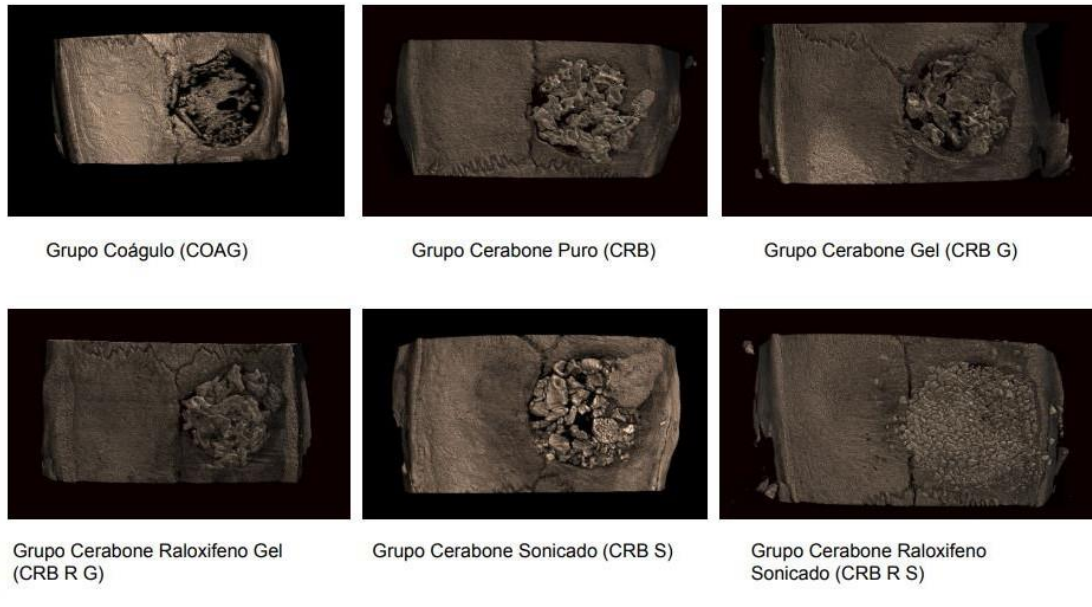
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 6: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o parâmetro IS.

Grupo	Valor de p	Diferença estatística
CB e CBG	<0,0001	sim
CB e CBRG	<0,0001	sim
CB e CBS	0,0088	sim
CB e CBRS	0,0003	sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

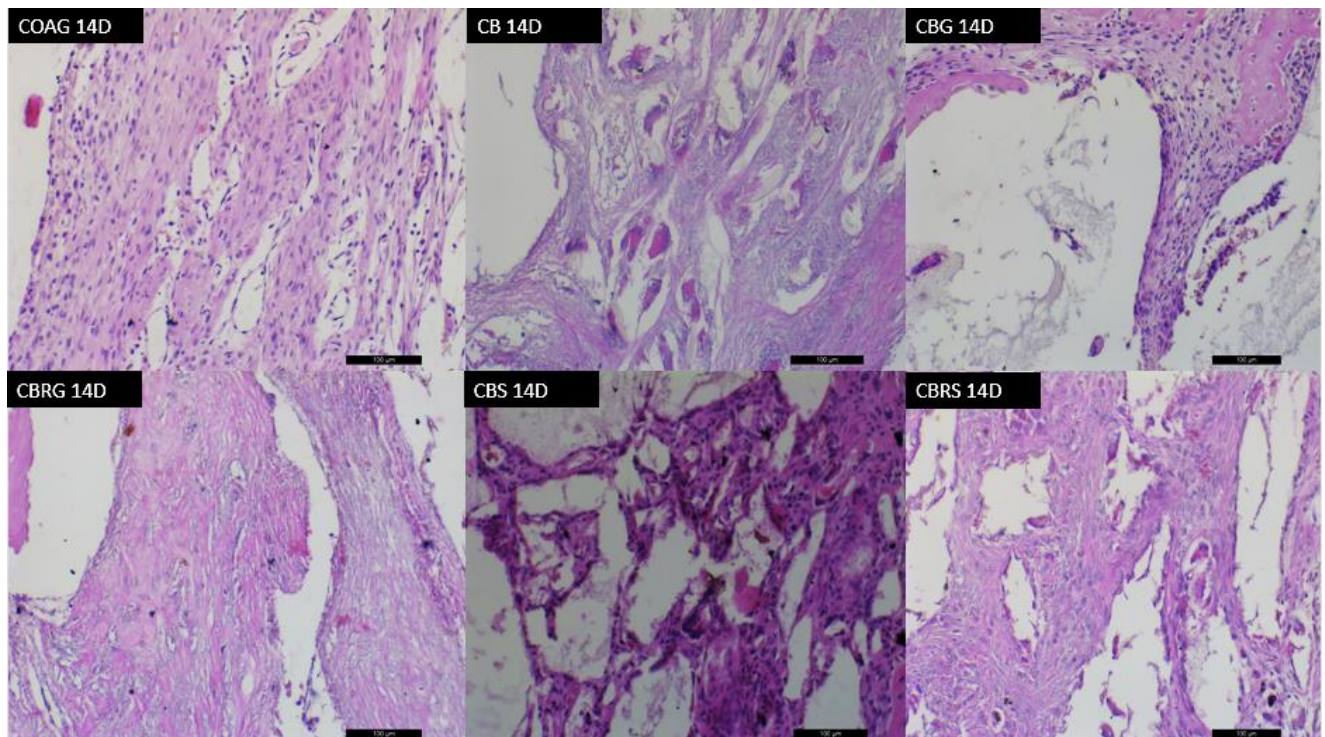
Figura 6: Imagens obtidas pelo software CTVox, representando a reconstrução realizada pelo escaneamento microtomográfico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

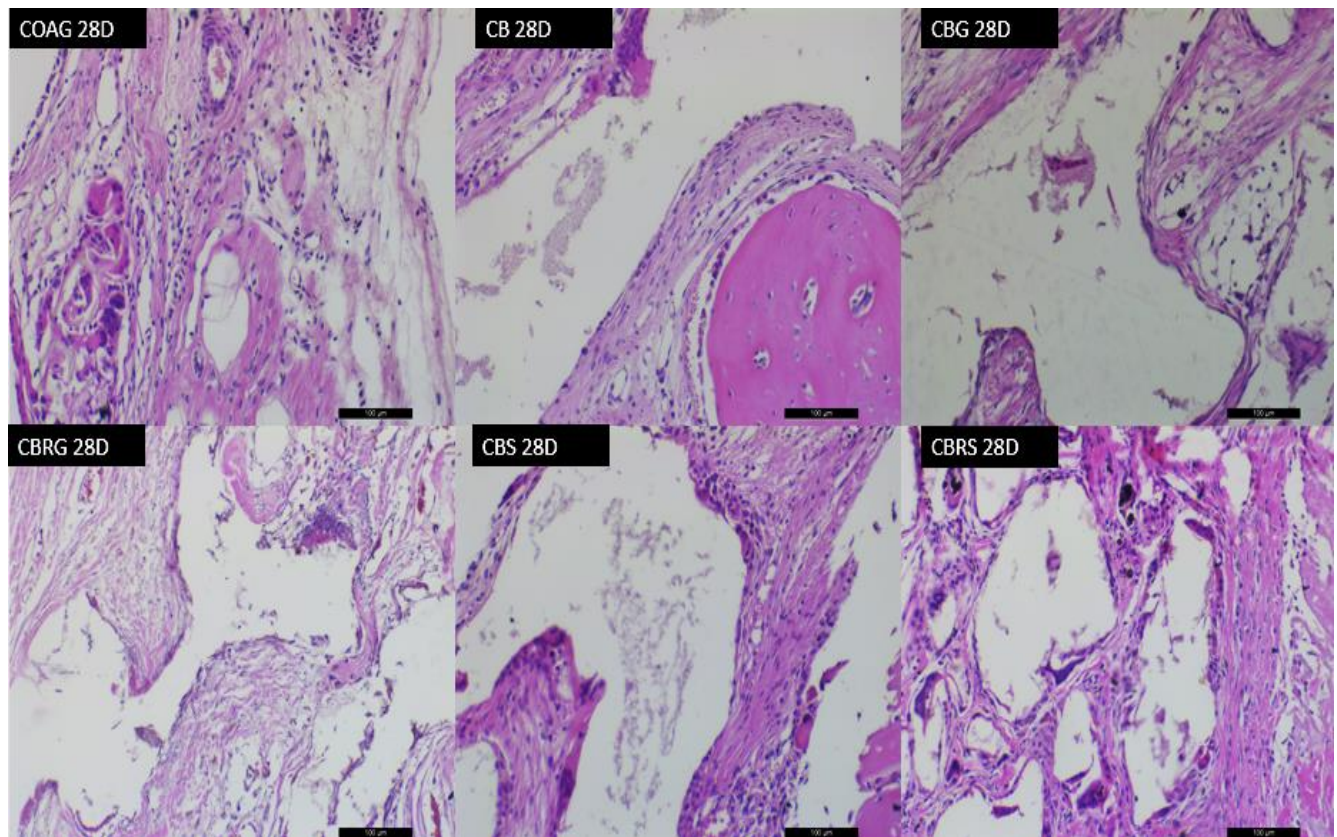
4.2 Análise Histológica

Figura 7: Análise histológica dos grupos experimentais aos 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 8: Análise histológica dos grupos experimentais aos 28 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.2.1 Grupo Coágulo (COAG)

No grupo COAG, aos 14 dias, observa-se histologicamente a região do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo em toda sua extensão. Neste tecido, observa-se células como fibroblastos, presença de vasos sanguíneos, fibras colágenas organizadas e predominando na área do defeito. Destaca-se também que não se nota infiltrado inflamatório na região. As bordas do defeito mostram o início de proliferação celular e de tecido ósseo em formação, partindo desta região do defeito. Aos 28 dias, observa-se uma maior proliferação de tecido ósseo neoformado das bordas em direção ao centro do defeito. No entanto, ainda se evidencia que grande parte do defeito mantém-se preenchido por tecido conjuntivo mais organizado que no período anterior dentro deste mesmo grupo.

4.2.2 Grupo Cerabone Puro (CRB)

No grupo CRB, aos 14 dias, observa-se grânulos do biomaterial preenchendo a extensão do defeito. As partículas mostram-se bem evidenciadas e envolvidas por tecido conjuntivo que em algumas regiões, mostra ilhas de tecido ósseo em formação. Aos 28 dias, observa-se grânulos do biomaterial que permanecem no defeito, envolvidos por tecido conjuntivo, caracterizado pela presença de fibras colágenas bem organizadas. As áreas de neoformação óssea entre os grânulos de biomateriais estão bastante evidenciadas. Em algumas áreas, observam-se macrófagos junto aos grânulos de biomaterial.

4.2.3 Grupo Cerabone Gel (CRB G)

No grupo CRB G, aos 14 dias, observa-se a extensão do defeito preenchida por biomaterial que se apresentou amorfo e envolto por células assim como a matriz extracelular do tecido conjuntivo. Células multinucleadas também foram observadas na região do defeito, junto ao biomaterial. No entanto, não há sinais de infiltrado inflamatório. Aos 28 dias, observa-se as partículas de biomaterial organizando-se em grânulos e sendo envolvidas por tecido conjuntivo e em alguns pontos, ilhas de tecido ósseo neoformado.

4.2.4 Grupo Cerabone Raloxifeno Gel (CRB R G)

No grupo CRB R G, observa-se que aos 14 dias, o defeito apresenta-se preenchido por biomaterial e envolvido por um tecido conjuntivo melhor organizado em comparação ao grupo CRB G. Em algumas áreas, observa-se ilhas de tecido conjuntivo neoformado na região central do defeito. Aos 28 dias, observa-se um tecido conjuntivo melhor organizado junto ao biomaterial e uma maior quantidade de áreas de neoformação óssea.

4.2.5 Grupo Cerabone Sonicado (CRB S)

No grupo CRB S aos 14 dias, observa-se partículas de biomaterial homogêneas e bem distribuídas no defeito ósseo. As partículas apresentam-se envolvidas por tecido conjuntivo bastante celularizado e em alguns pontos, já com formação óssea

incipiente. Aos 28 dias, observa-se processo de reparo melhor desenvolvido, apresentando mais áreas de neoformação óssea.

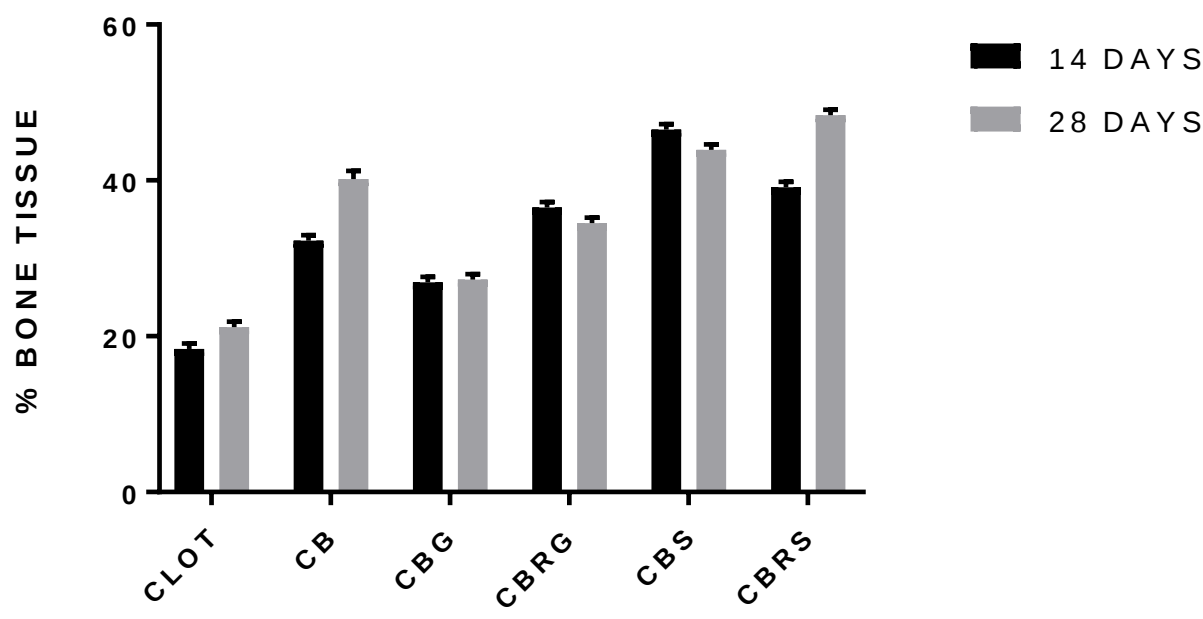
4.2.6 Grupo Cerabone Raloxifeno Sonicado (CRB R S)

No grupo CRB R S, observa-se partículas do biomaterial envoltas por tecido conjuntivo pouco celularizado e mostrando-se num estágio de maturação superior ao grupo anterior. São evidenciadas as partículas com menores dimensões e maior quantidade de tecido conjuntivo organizado e áreas de tecido ósseo neoformado. Aos 28 dias, observam-se as partículas homogêneas e em menores dimensões envoltas por tecido conjuntivo maduro e tecido ósseo conectando as partículas de biomateriais em muitas regiões do defeito confeccionado. Fica bastante evidente a maior maturidade do reparo ósseo observado neste grupo experimental em comparação aos demais, aos 14 e especialmente aos 28 dias pós operatórios.

4.3 Análise Histométrica

De forma semelhante à microtomografia computadorizada, a análise estatística foi realizada comparando o grupo Cerabone aos demais, exceto o grupo Coágulo, pois o objetivo é avaliar se houve aprimoramento do biomaterial em comparação a sua versão de fábrica.

Gráfico 6: Percentual de tecido ósseo encontrado nas lâminas histológicas, por meio da análise histométrica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

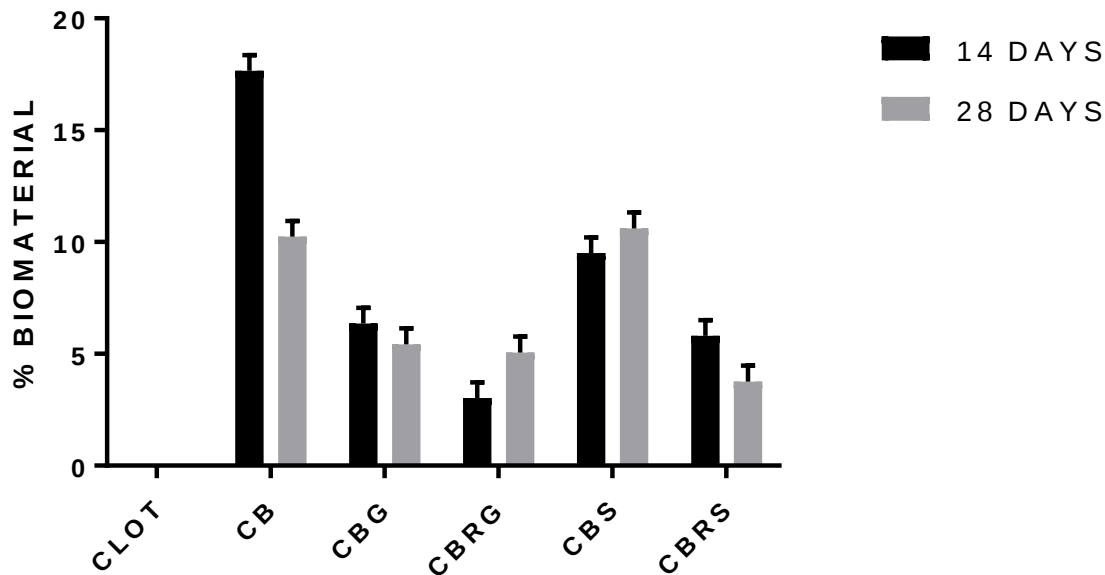
Quanto a formação de tecido ósseo na região do defeito, observa-se que aos 14 dias o grupo que obteve maior valor foi o grupo CBS e o menor valor para o grupo Coágulo. Aos 28 dias, o grupo que o melhor grupo foi CBRS e o pior valor foi o grupo Coágulo. Houve diferença estatística entre os grupos CB e CBG; CB e CBRG; CB e CBS e CB e CBRS, aos 14 e 28 dias.

Tabela 7: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para a quantidade de tecido ósseo.

Grupo	Valor de p 14D	Valor de p 28D	Diferença estatística 14D	Diferença estatística 28D
CB e CBG	0,0001	<0,0001	Sim	Sim
CB e CBRG	0,0010	<0,0001	Sim	Sim
CB e CBS	<0,0001	0,0029	Sim	Sim
CB e CBRS	<0,0001	<0,0001	sim	sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Gráfico 7: Percentual de biomaterial remanescente no tecido encontrado nas lâminas histológicas, por meio da análise histométrica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para a quantidade de biomaterial remanescente no tecido, aos 14 dias o grupo CB foi o que obteve maior valor, enquanto o menor valor está presente no grupo CBRG. Aos 28 dias, o grupo CBS representa o maior valor, e o grupo CBRS o valor mais baixo. Houve diferença estatística, aos 14 dias, entre os grupos CB e CBG; CB e CBRG; CB e CBS e CB e CBRS. Aos 28 dias, houve diferença estatística entre os grupos CB e CBG; CB e CBRG e CB e CBRS.

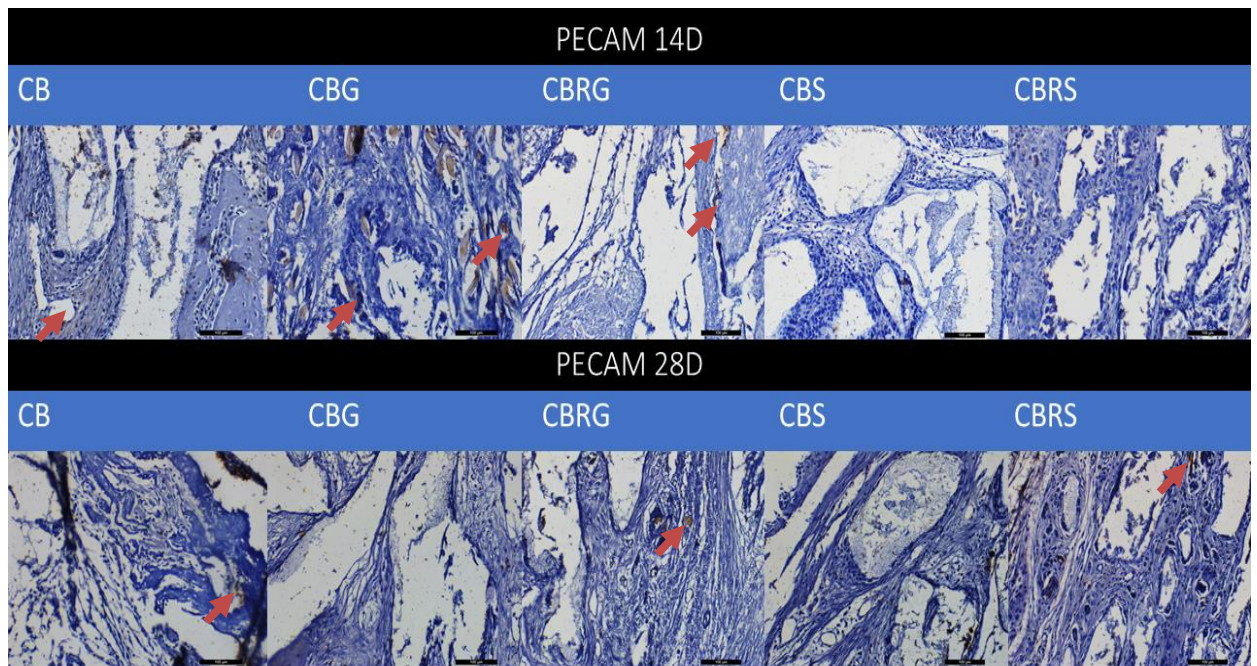
Tabela 8: Relação entre os grupos e a presença de diferença estatística para o remanescente de biomaterial.

Grupo	Valor de p 14D	Valor de p 28D	Diferença estatística 14D	Diferença estatística 28D
CB e CBG	<0,0001	<0,0001	Sim	Sim
CB e CBRG	<0,0001	<0,0001	Sim	Sim
CB e CBS	<0,0001	0,9911	Sim	Não
CB e CBRS	<0,0001	<0,0001	sim	Sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.4 Imunoistoquímica

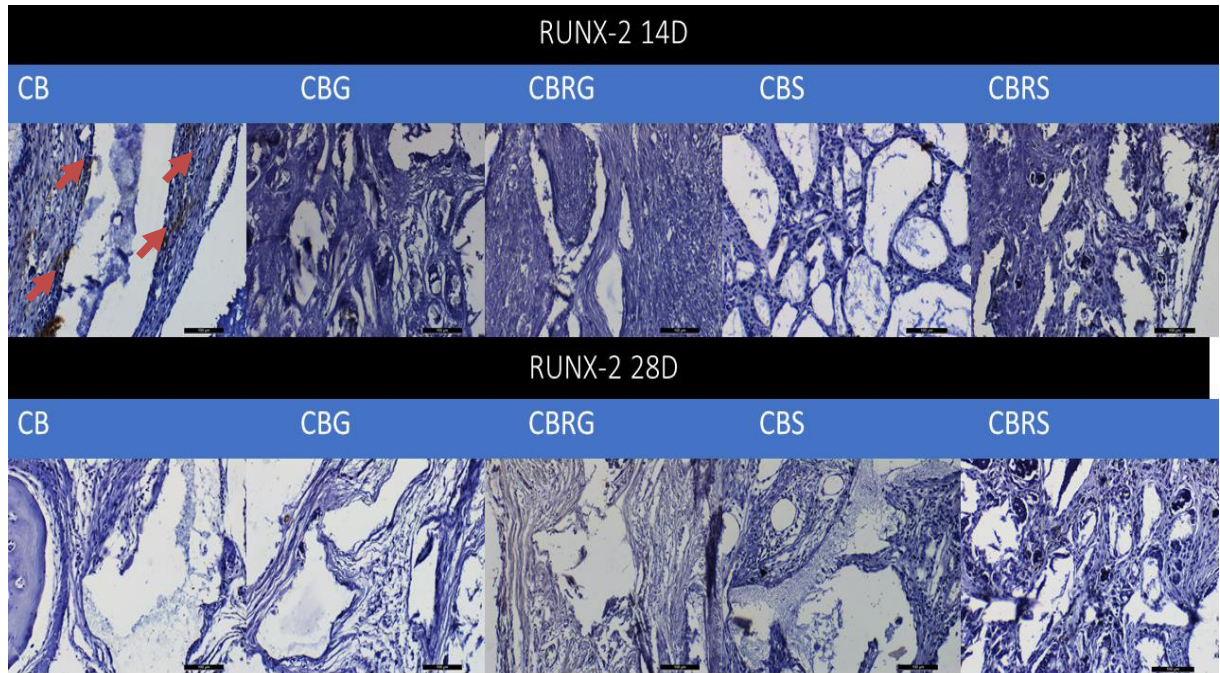
Figura 9: Imunomarcção de PECAM (VEGF) para os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A PECAM mostrou-se marcada discretamente em todos os grupos avaliados. Uma possível justificativa seriam os períodos avaliados, uma vez que 14 e 28 dias para o nosso modelo experimental seriam períodos tardios para a avaliação deste marcador. As setas indicam as áreas onde foram observadas marcação positiva para PECAM.

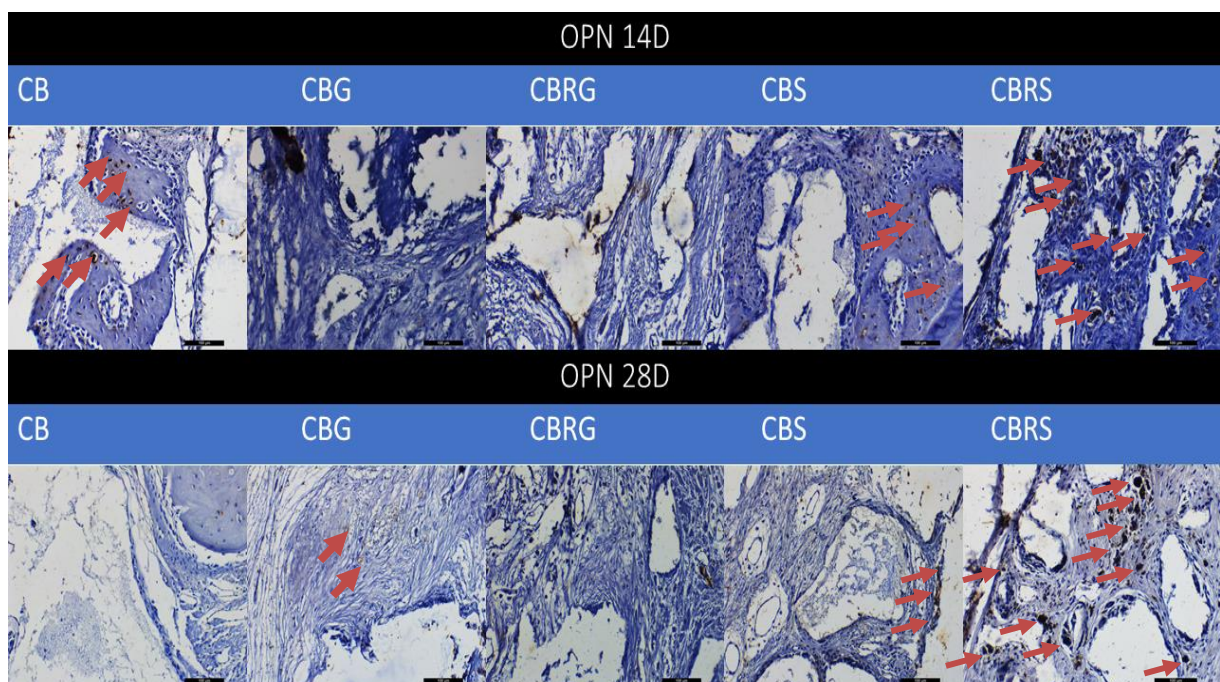
Figura 10: Imunomarcção de RUNX-2 para os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A RUNX-2, fator de transcrição que marca a etapa de diferenciação osteoblástica mostrou-se marcado positivamente no grupo cerabone, de forma moderada. Nos demais grupos, não foi evidenciada presença deste fator de transcrição.

Figura 11: Imunomarcacão de OPN para os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Osteopontina mostrou-se marcada de forma moderada a intensa no grupo Cerabone puro. Nos grupos gel (tanto cerabone como cerabone raloxifeno), não foi evidenciada marcação para esta proteína. Nos grupos submetidos a sonoquímica, foi observada importante marcação positiva para a osteopontina. No caso do grupo cerabone sonificado, observou-se marcação positiva de forma moderada tanto aos 14 como aos 28 dias, especialmente junto às partículas de biomaterial. No grupo cerabone raloxifeno sonificado, observou-se também marcação da osteopontina de forma moderada aos 14 dias e de forma moderada a intensa aos 28 dias. Observou-se a presença especialmente nas células localizadas junto aos remanescentes do biomaterial.

5 Discussão

No presente estudo, a proposta foi de avaliar o desempenho do Cerabone® em diferentes apresentações associado ou não a uma biomolécula cujo efeito local apresenta potencial para atuar nas respostas reparacionais, contribuindo possivelmente para a melhora nas reconstruções ósseas dos defeitos de calvária. A biomolécula em questão trata-se do Raloxifeno, um modulador seletivo de receptores de estrógeno, cuja atuação direta nestes receptores presentes em osteoblastos pode desencadear a ativação de processos de formação óssea. Estudos anteriores do nosso grupo mostram que este fármaco administrado sistemicamente, classificado como anti-reabsortivo, possui um efeito favorável sobre o processo de reparo ósseo, seja em alvéolos ou após a instalação de implantes, promovendo uma redução na atividade osteoclástica e ao mesmo tempo, ativando osteoblastos, levando a melhora nas respostas reparacionais (39, 40, 41, 42, 43). A idéia de utilizar este fármaco com efeito local deve-se ao seu papel seletivo a receptores de estrógeno, o que poderia desencadear uma ativação osteoblástica “in situ”.

A proposta de utilizar a sonoquímica como uma ferramenta que permite a incorporação homogênea de biomoléculas a biomateriais já foi investigada em nosso grupo de pesquisa (45, 46). A sonoquímica mostrou-se como uma ferramenta eficaz e que possibilitou a obtenção de um resultado onde a biomolécula foi homogeneamente incorporada ao biomaterial. Uma vez determinada a padronização

da técnica sonoquímica assim como o biomaterial e biomolécula a serem avaliados, passamos para o desenvolvimento da presente proposta. No entanto, vale destacar que a associação Cerabone® e Raloxifeno foi avaliada em estudo anterior do nosso grupo, onde cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos foram realizadas e preenchidas com esta combinação (47). Neste estudo, observou-se que a sonoquímica entre Raloxifeno e Cerabone® promoveu uma melhora nas respostas celulares observadas no tecido ósseo reparacional formado em resposta às cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos. No entanto, consideramos que a utilização deste modelo experimental (coelhos) dificultou quanto a caracterização de aspectos reparacionais que podem contribuir para o entendimento das respostas biológicas observadas frente ao biomaterial testado. Assim, em função deste estudo anterior (47) o presente projeto foi idealizado. A utilização de ratos permitiu que avaliássemos as respostas biológicas em dois períodos e uma questão importante incorporada a este estudo foi a adição do grupo Gel (Cerabone e Cerabone/Raloxifeno). Este foi outro questionamento que surgiu quanto ao teste de outras formas de incorporação da biomolécula ao biomaterial.

Os resultados apresentados neste projeto referem-se à avaliação de uma amostra por grupo na análise das microtomografias, além da avaliação histológica qualitativa realizada nos espécimes submetidos à histotécnica e coloração por HE.

Os resultados microtomográficos apresentados refletem a média de 3 animais de cada grupo e os resultados foram bastante interessantes, mostrando que tanto o Cerabone Gel como o Cerabone Sonicado apresentam resultados superiores ao Cerabone convencional, vindo de fábrica, onde o grupo CB R S mostrou-se superior aos demais em diferentes parâmetros que refletem uma melhora na qualidade óssea. Vale destacar que estes resultados estão de acordo com os resultados observados nas avaliações histológicas (HE) que foram observadas anteriormente e que estão descritas na sequência. A análise descritiva/qualitativa dos cortes corados por Hematoxilina e Eosina mostram que mais uma vez, tanto Cerabone Gel como Cerabone Sonicado, associado ou não ao Raloxifeno mostraram resultados superiores do ponto de vista biológico. Nestes grupos, especialmente no grupo sonicado sozinho ou em associação ao Raloxifeno, observa-se uma melhor incorporação das partículas ao tecido reparacional refletindo numa formação de tecido conjuntivo/tecido ósseo bem desenvolvido e que podem ser correlacionados à melhor resposta reparacional. No grupo sonicado, destacamos que a associação com

Raloxifeno promoveu resultados superiores ao grupo Cerabone Sonicado.

6 Conclusão

Os resultados demonstram que a sonoquímica parece ser uma estratégia promissora quando o objetivo é melhorar a bioatividade de biomateriais. A associação com raloxifeno promoveu melhoras na resposta reparacional. Mais estudos são necessários para que estes achados sejam confirmados.

REFERÊNCIAS:

- 1- Gunilla N, Thomas D, Goran GÖRAN G, Gert H, Margareta H, et al. Qualitative studies of patients' perceptions of loss of teeth, the edentulous state and prosthetic rehabilitation: A systematic review with meta-synthesis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013; 71: 938–952.
- 2- Mattia P, Gian PS, Renata V, Roberto F, Leonardo T. Alveolar ridge dimensions in mandibular posterior regions: a retrospective comparative study of dentate and edentulous sites using computerized tomography data. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2018 Dec; 40(12): 1419-1428.
- 3- Farina R, Pramstraller M, Franceschetti G, Pramstraller C, Trombelli L. Alveolar ridge dimensions in maxillary posterior sextants: a retrospective comparative study of dentate and edentulous sites using computerized tomography data. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22:1138–1144.
- 4- Bassir SH, Alhareky M, Wangsrimongkol B, Jia Y, Karimbux N. Systematic Review and Meta-Analysis of Hard Tissue Outcomes of Alveolar Ridge Preservation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 Sep/Oct;33(5):979-994.
- 5- Cavalcanti MC, Guirado TE, Sapata VM, Costa C, Pannuti CM, Jung RE, César Neto JB. Maxillary sinus floor pneumatization and alveolar ridge resorption after tooth loss: a cross-sectional study. *Braz Oral Res*. 2018 Aug 6;32:e64.
- 6- Rickert D1, Slater JJ, Meijer HJ, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Feb;41(2):160-7.
- 7- Sanz-Sánchez I, Ortiz-Vigón A, Sanz-Martín I, Figuero E, Sanz M. Effectiveness of lateral bone augmentation on the alveolar crest dimension: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2015; 94(9 suppl):128S-142S.
- 8- Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, et al. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; 15: 481–489.
- 9- Watanabe K, Niimi A, Ueda M. Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Jul;88(1):26-32.
- 10- Tong DC, Rioux K, Drangsholt M, Beirne OR. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:175–82.
- 11- Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T, editors. *Tissue Integrated Prostheses*. Chicago: Quintessence Publishing Co; 1986. p. 199–209.

- 12- Raghoobar, G.M.; Meijndert, L.; Kalk, W.W.; Vissink, A. Morbidity of mandibular bone harvesting: A comparative study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2007, 22, 359–365.
- 13- Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):396-400.
- 14- Corning PJ, Mealey BL. Ridge preservation following tooth extraction using mineralized freeze-dried bone allograft compared to mineralized solvent-dehydrated bone allograft: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2019 Feb; 90(2): 126-133.
- 15- Li P, Zhu HC, Huang DH. Autogenous DDM versus Bio-Oss granules in GBR for immediate implantation in periodontal postextraction sites: A prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018; 20: 923– 928.
- 16- Takahata M, Ito M, Abe Y, Abumi K, Minami A. The effect of anti-resorptive therapies on bone graft healing in an ovariectomized rat's parathyroidectomy model. *Bone*. 2008 Dec;43(6):1057-66.
- 17- Fujisawa K, Akita K, Fukuda N, Kamada K, Kudoh T, Ohe G, Mano T, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y. Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution-precipitation reaction and Bio-Oss. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jul 21;29(8):121.
- 18- de Molon RS, Magalhaes-Tunes FS, Semedo CV, Furlan RG, de Souza LGL, de Souza Faloni AP, Marcantonio E Jr, Faeda RS. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019 Jun;48(6):810-823.
- 19- Nart J, Barallat L, Jimenez D, et al. Radiographic and histological evaluation of deproteinized bovine bone mineral vs. deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen in ridge preservation. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28:840–848.
- 20- Valentini P, Abensur DJ. Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:556---60.16.
- 21- Skoglund A, Hising P, Young C. A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12:194---9.
- 22- Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8:117--- 20.
- 23- CL Cardoso, C Curra, PL Santos, MFM Rodrigues, O Ferreira-Júnior, PSP de Carvalho. Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. *Rev Clin Periodontol Implantol Rehabil Oral*. 2016;9(2):102---107.
- 24- Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;7:CD003607.
- 25- Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgir M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. *J Adv Pharm Technol Res*. 2019 Apr-Jun;10(2):46-50.
- 26- Sohn DS, Moon YS. Histomorphometric study of rabbit's maxillary sinus augmentation with various graft materials. *Anat Cell Biol*. 2018 Dec; 51(Suppl 1):S1-S12.
- 27- Gomes-Ferreira, Pedro & Noronha Lisboa-Filho, Paulo & Carolina da Silva, Ana & Bim-júnior, Odair & Roberto de Souza Batista, Fábio & Cláudia Ervolino Silva, Ana & Garcia-Júnior, Idelmo & Okamoto, Roberta. (2019). Sonochemical time standardization for bioactive materials used in perimplantar defects filling. *Ultrasonics Sonochemistry*. 10.1016/j.ultsonch.2019.04.032.
- 28- A.S. Nikoghosyan, H. Ting, J. Shen, R.M. Martirosyan, M.Yu. Tunyan, A.V. Papikyan, A.A. Papikyan. *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2016, Vol. 51, No. 3, pp. 256–264.
- 29- Puišys A1, Žukauskas S, Kubilius R, Vindašiūtė E, Linkevičius T. Bone augmentation and

- simultaneous soft tissue thickening with collagen tissue matrix derivate membrane in an aesthetic area. A case report. *Stomatologija*. 2017;19(2):64-68.
- 30- Lisboa-Filho PN, Gomes-Ferreira PHS, Batista FRS, Momesso GAC, Faverani LP, Okamoto R. Bonerepairwithraloxifeneandbioglassnanoceramiccomposite in animal experiment. *Connect Tissue Res*. 2018 Dec;59(sup1):97-101.
 - 31- Bang JH, Suslick KS. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *Adv Mater*. 2010 Mar 12;22(10):1039-59.
 - 32- Arruda LB, Orlandi MO, Lisboa-Filho PN. Morphological modifications and surface amorphization in ZnOsonochemically treated nanoparticles. *UltrasonSonochem*. 2013 May;20(3):799-804.
 - 33- Arruda LB, Orlandi MO, Lisboa-Filho PN. Morphological modifications and surface amorphization in ZnOsonochemically treated nanoparticles. *UltrasonSonochem*. 2013 May;20(3):799-804.
 - 34- Griffin, K.S.; Davis, K.M.; McKinley, T.O.; Anglen, J.O.; Chu, T.M.G.; Boerckel, J.D.;Kacena, M.A. Evolution ofBoneGrafting: BoneGraftsandTissueEngineeringStrategiesforVascularizedBoneRegeneration. *Clin. Rev. Bone Min. Metab*. 2015, 13, 232–244. [CrossRef]
 - 35- Kolk, A.; Handschel, J.; Drescher, W.; Rothamel, D.; Kloss, F.; Blessmann, M.; Heiland, M.; Wolff, K.D.; Smeets, R. Currenttrendsand future perspectives ofbonesubstitutematerials—Fromspaceholderstoinnovativebiomaterials. *J. Cranio-Maxillofac. Surg*. 2012, 40, 706–718
 - 36- Ureña YRC, Bettini SHP, Muñoz PR, Wittig L, Rischka K, Lisboa-Filho PN. In situ sonochemical synthesis of ZnO particles embedded in a thermoplastic matrix for biomedical applications. *MaterSciEng C MaterBiolAppl*. 2015 Apr;49:58-65.
 - 37- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.
 - 38- Transparency Market Research. Dental Membrane and Bone Graft Substitutes Market; Transparency Market Research: Albany, NY, USA, 2016.
 - 39- LUVIZUTO, Eloá Rodrigues *et al*. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. **Elsevier**, Araújoatuba, p. 1021-1029, 2010.
 - 40- LUVIZUTO,Eloá Rodrigues *et al*/Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 55, n. 1,p.52-59,jan. 2010. Elsevier BV.<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.11.001>.
 - 41- LUVIZUTO, Eloá R.; DIAS, Sheila S.M.D.; OKAMOTO, Tetuo; DORNELLES, RitaC.M.; OKAMOTO, Roberta. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 56, n. 10, p. 984,990, out. 2011. Elsevier BV.<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.015>.
 - 42- RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L.P.; PRADO, F.B.; GARCIA, I.R.; OKAMOTO,R..Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. **International Journal Of Oral And Maxillo facialSurgery**, [S.L.], v.44, n. 6, p. 798-805, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.02.018>.
 - 43- YOGUI, Fernanda Costa; MOMESSO, Gustavo Antonio Correa; FAVERANI, Leonardo Perez; POLO, TarikoOcon Braga; RAMALHO-FERREIRA, Gabriel; HASSUMI, Jaqueline Suemi; ROSSI, Ana Cláudia; FREIRE, Alexandre Rodrigues; PRADO, FelipeBevilacqua; OKAMOTO, Roberta. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model

- of osteoporosis. **Journal Of Applied Oral Science**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 1-13, 7 maio 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0329>.
- 44- FAVERANI, Leonardo Perez; POLO, Táríkocon Braga; RAMALHO-FERREIRA, Gabriel; MOMESSO, Gustavo Antonio Correa; HASSUMI, Jaqueline Suemi; ROSSI, Ana Cláudia; FREIRE, Alexandre Rodrigues; PRADO, FelipeBevilacqua; LUVIZUTO, Eloá Rodrigues; GRUBER, Reinhard. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clinical Oral Investigations**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 255-265, 29 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2106-2>.
- 45- LISBOA-FILHO, Paulo N.; GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique S.; BATISTA, Fábio R. S.; MOMESSO, Gustavo A. C.; FAVERANI, Leonardo P.; OKAMOTO, Roberta. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. **Connective Tissue Research**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 97-101, 10 maio 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03008207.2018.1430143>.
- 46- GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique Silva; LISBOA-FILHO, Paulo Noronha; SILVA, Ana Carolina da; BIM-JôNIOR, Odair; BATISTA, Fábio Roberto de Souza; ERVOLINO-SILVA, Ana Cláudia; GARCIA-JUNIOR, Idelmo Rangel; OKAMOTO, Roberta. Sonochemical time standardization for bioactive materials used in periimplantar defects filling. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.L.], v. 56, p. 437-446, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.04.032>.
- 47- SIQUEIRA, Natália Barbosa de; SILVA, Ana Cláudia Ervolino da; PEREIRA, Rodrigo dos Santos; HOCHULI-VIEIRA, Eduardo; LISBOA-FILHO, Paulo Noronha; DEUS, Ciro Borges Duailibe de; OKAMOTO, Roberta. Different responses of heterogeneous graft presentations in bone reconstructions during sinus lift elevation surgery: an immunolabeling and histomorphometric study performed in rabbits. **Frontiers Of Oral And Maxillofacial Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-1, 10 mar. 2022. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/fomm-21-45>.