

DANIEL SILVA LEÃO

**DESEMPENHO DE IMPLANTES FUNCIONALIZADOS COM
DIFERENTES BIOMOLÉCULAS NO REPARO PERI-
IMPLANTAR EM RATAS COM DEFICIÊNCIA DE
ESTRÓGENO. ANÁLISES BIOMECÂNICA E MOLECULAR**

Araçatuba - SP
2024

DANIEL SILVA LEÃO

**DESEMPENHO DE IMPLANTES FUNCIONALIZADOS COM
DIFERENTES BIOMOLÉCULAS NO REPARO PERI-
IMPLANTAR EM RATAS COM DEFICIÊNCIA DE
ESTRÓGENO. ANÁLISES BIOMECÂNICA E MOLECULAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba - SP
2024

Dedico esse trabalho a minha família, sem eles nada seria possível, em especial em memória de meu pai que partiu dessa caminhada, mas em sua passagem nunca mediu esforços para me ver feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amigos por serem a minha família durante a faculdade, sem eles o percurso seria muito mais difícil e sem cor, por todos laços construídos, momentos vividos e tudo mais que não seria possível colocar em palavras.

Agradeço a minha orientadora Roberta Okamoto por ter sido um exemplo de profissional e pessoa, sempre disposta a ajudar, nos incentivando a crescer, agradeço pelo acolhimento, pelas oportunidades, por me mostrar a ciência e todo seu processo, sempre serei grato.

Agradeço ao grupo do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados pelo acolhimento e ambiente de trabalho ímpar, em especial agradeço à Paula Frigério por toda tutoria e ajuda nessa caminhada, aos colegas de laboratório, de departamento meu muito obrigado.

Agradeço a minha família, sem eles nada disso seria possível, nunca mediram esforços para que eu realizasse um sonho. A minha mãe Dilene por ter sido fortaleza, a minha irmã Taylana por todo cuidado e amor. A minha tia Cicera por toda ajuda incondicional. E ao meu pai Juvencio por tudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento da pesquisa (Processo nº 2022/14140-8), me permitindo fazer ciência, realizar análises, apresentações em congressos e todo enriquecimento envolvido.

Agradeço também a mim por ter conseguido chegar até aqui, pois o caminho não foi fácil.

RESUMO

LEÃO, D. S. **Desempenho de implantes funcionalizados com diferentes biomoléculas no reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno. Análises biomecânica e molecular.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Alterações hormonais pós-menopausa favorecem o aparecimento de doenças ósseas como a osteoporose, afetando negativamente a renovação óssea. Uma das estratégias que ajuda o reparo ósseo consiste em funcionalizar a superfície de implantes, adicionando biomoléculas que favorecem as etapas reparacionais. Neste sentido, a genisteína e a teriparatida são substâncias que têm propriedades relevantes para o reparo ósseo. O objetivo foi caracterizar pela análise biomecânica (torque de remoção) e RT-PCR a osseointegração e reparo peri-implantar, dado pela adição de genisteína e teriparatida em diferentes concentrações à superfície de implantes, instalados em tíbia de ratas normais e sob condições que mimetizam a osteoporose. Utilizou-se 48 ratas, (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultas, peso médio de 300g. Foram divididas em 2 grupos: SHAM (ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral) e OVX (ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral), cada grupo tendo 24 ratas, divididas igualmente em 3 subgrupos segundo a funcionalização do implante, sendo CONV, GEN 100 mM e TERI 10 ng. Após 30 dias da ovariectomia fictícia e real, todos animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes nas metáfises proximais das tíbias direita e esquerda. Utilizou-se 96 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com as superfícies convencionais ou tratadas com genisteína ou teriparatida. A eutanásia dos animais ocorreu aos 28 dias após a instalação dos implantes e as tíbias foram destinadas para as análises: RT-PCR em tempo real (IBSP, ALP e OCN) na tíbia direita, e na esquerda realizou o torque de remoção. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade. Para todos os testes adotou-se nível de significância de 5%. Através das análises concluímos que genisteína mostrou melhor eficiência na osseointegração de implantes de titânio em animais com comprometimento sistêmico (deficiência de estrógeno).

Palavras-chave: osteoporose; osseointegração; genisteína; teriparatida.

ABSTRACT

LEÃO, D. S. **Performance of implants functionalized with different biomolecules in peri-implant repair in estrogen-deficient rats. Biomechanical and molecular analyzes.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Post-menopausal hormonal changes favor the appearance of bone diseases such as osteoporosis, negatively affecting bone renewal. One of the strategies that helps bone repair consists of functionalizing the surface of implants, adding biomolecules that favor the repair stages. In this sense, genistein and teriparatide are substances that have relevant properties for bone repair. The objective was to characterize, through biomechanical analysis (removal torque) and RT-PCR, osseointegration and peri-implant repair, achieved by the addition of genistein and teriparatide in different concentrations to the surface of implants, installed in the tibia of normal rats and under conditions that mimic osteoporosis. 48 adult female rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) were used, with an average weight of 300g. They were divided into 2 groups: SHAM (rats undergoing fictitious bilateral ovariectomy surgery) and OVX (rats undergoing bilateral ovariectomy surgery), each group having 24 rats, equally divided into 3 subgroups according to the functionalization of the implant, being CONV, GEN 100 mM and TERI 10 ng. After 30 days of fictitious and real ovariectomy, all animals underwent surgery to install implants in the proximal metaphyses of the right and left tibias. 96 commercially pure grade IV titanium implants were used with conventional surfaces or surfaces treated with genistein or teriparatide. The animals were euthanized 28 days after the installation of the implants and the tibias were used for analysis: real-time RT-PCR (IBSP, ALP and OCN) on the right tibia, and on the left the removal torque was performed. Quantitative data were subjected to the normality test. For all tests, a significance level of 5% was adopted. Through analysis, we concluded that genistein showed better efficiency in the osseointegration of titanium implants in animals with systemic impairment (estrogen deficiency).

Keywords: osteoporosis; osseointegration; genistein; teriparatide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo dos grupos experimentais SHAM e OVX	20
Figura 2 – Sequência do transoperatório da cirurgia de ovariectomia	21
Figura 3 – Sequência do transoperatório do procedimento de instalação dos implantes	23
Figura 4 – Análise estatística do torque de remoção (análise biomecânica) dos grupos SHAM e OVX, $p < 0,05$, ANOVA two-way	26
Figura 5 – Análise estatística da expressão relativa do gene IBSP dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way	27
Figura 6 – Análise estatística da expressão relativa do gene OCN dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way	28
Figura 7 – Análise estatística da expressão relativa do gene ALP dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento dos grupos propostos

19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
µg	Micrograma
cm	Centímetro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
N	Newton
ng	Nanograma
nº	Número
°C	Graus célsius
p	Probabilidade
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSS	Poliestireno sulfonado
PVPI	Polivinil pirrolidona iodo
RT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
UI	Unidade internacional
vs	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Experimentos <i>in vivo</i> com o Modelo Experimental proposto	14
3.2 Ciclo estral	15
3.3 Cirurgia fictícia e de ovariectomia	15
3.4 Funcionalização da superfície dos implantes	16
3.5 Cirurgia de instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias	17
3.6 Eutanásia – 28 dias após a instalação dos implantes	19
3.7 Torque de remoção (análise biomecânica)	20
3.8 Análise molecular (PCR em tempo real)	20
4 RESULTADOS	22
4.1 Torque de remoção	22
4.2 Análise da expressão gênica relativa (RT-PCR)	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	33

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, a população mundial começou a envelhecer e com isso surgiram novas preocupações com essa classe etária em relação a sua saúde. Sabe-se que as doenças ósseas como osteoporose e osteopenia vem aumentando sua prevalência na população acima de 50 anos e cada vez mais indivíduos apresentam alto risco de fratura, sendo que esse número pode duplicar seus casos até 2040, chegando a 316 milhões de pessoas ao redor do mundo com esse risco, mostrando um aumento considerável (1).

Podemos classificar a osteoporose como uma doença sistêmica multifatorial que acomete o esqueleto ósseo, tendo como característica principal a perda óssea progressiva, decorrente de um desequilíbrio da atividade de remodelação óssea, assim, comprometendo a microestrutura, favorecendo fraturas em diversos locais do corpo e que se associam constantemente ao aumento da morbidade e mortalidade (2-4). Além disso, a osteoporose é reconhecida como um problema de saúde significativo, sendo que a Fundação Internacional de Osteoporose (IOF) coloca o tratamento da doença como prioridade de saúde pública (5).

Os indivíduos acima dos 50 anos, especialmente as mulheres, estão mais vulneráveis à osteoporose, chegando a acometer 30% desta população (5). Isso ocorre pois no período pós-menopausa há alterações hormonais, que levam uma depleção nos níveis de estrógeno acarretando em um desequilíbrio do *turnover* ósseo (6,7), fazendo com que os processos reabsortivos prevaleçam sobre os de formação óssea e concomitantemente a isso há um aumento da reabsorção endocortical óssea e diminuição da deposição periosteal, resultando em um tecido ósseo de baixa qualidade com densidade mineral reduzida (8,9).

Cada vez mais pacientes osteoporóticos buscam por tratamentos reabilitadores orais, como a instalação de implantes dentários, com finalidade de melhorar a qualidade de vida, seja por estética, função ou até mesmo fonação (10-12). Com lugar de destaque os implantes osseointegrados promoveram um grande avanço na reabilitação oral, com um prognóstico de sucesso próximo a 100% (13), a osseointegração se dá pela união direta, estrutural e funcional do implante com o tecido ósseo (14). Todavia, a literatura mostra que em indivíduos com osteoporose há um prejuízo da osseointegração, de forma a tardar o processo de reparo ósseo

ao redor das espiras dos implantes, podendo gerar intercorrências que dificultam sua estabilidade e por fim comprometem o sucesso da reabilitação (10,12).

Diante da necessidade, surgiram diversos tratamentos farmacológicos para a osteoporose, buscando uma melhora na qualidade óssea. A FDA (*Food and Drug Administration*) classifica a terapia medicamentosa em antirreabsortivos e anabólicos. O grupo dos antirreabsortivos é constituído pelos moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS), denosumab, calcitonina e bifosfonatos. Enquanto os anabólicos são o paratormônio (PTH 1,34) e ranelato de estrôncio (15).

Embora existam muitas opções de tratamento no mercado, os fármacos de escolha para o tratamento da osteoporose são os antirreabsortivos, dentre eles os bifosfonatos (16,17), que inibem a diferenciação e atividade dos osteoclastos através do bloqueio da via do mevalonato na síntese do colesterol, assim, inibindo a enzima farnesil difosfato sintase, essencial para a prenilação de pequenas GTPases, as quais são fundamentais para as atividades osteoclásticas (18,19).

Entretanto, na odontologia há ressalvas quanto ao uso de bifosfonatos, devido à ocorrência de osteonecrose dos maxilares em tratamentos de longa duração (16,17). Podemos observar o comprometimento ósseo de um tratamento prolongado em estudos com ratas ovariectomizadas que foram tratadas com alendronato de sódio, da classe dos bifosfonatos, onde houve um prejuízo do reparo alveolar e peri-implantar, além de reduzir o *turnover* ósseo resultando em um osso de qualidade insatisfatória (20,21).

Ainda que haja terapias medicamentosas alternativas, como o raloxifeno, calcitonina e teriparatida, que apresentem melhores resultados no reparo ósseo peri-implantar, esses fármacos causam efeitos adversos piores a longo prazo do que os observados nos bifosfonatos (22-25).

Com isso, opções terapêuticas locais têm sido consideradas com o intuito de melhorar as respostas celulares nos eventos reparacionais e como consequência, melhorar a osseointegração. Nesse contexto, temos a funcionalização dos implantes, que é um método onde moléculas da superfície do implante são distribuídas de maneira proporcional no tecido reparacional peri-implantar, desse modo reduzindo efeitos adversos de uma administração sistêmica. Existem vários métodos para modificar a superfície do implante, incluindo jateamento de areia,

ataque ácido, anodização, *dip-coatings* e técnicas *layer-by-layer*. Este último envolve a imersão de um substrato sólido (muitas vezes com alguma carga desequilibrada em sua superfície) por um período de tempo em uma solução aquosa contendo o material a ser depositado para que ocorra uma adsorção por atração eletrostática, posteriormente esse conjunto de substrato e monocamada é lavado para remoção de excessos e seco e imergido em outra solução de carga contrária à última, assim formando várias camadas ultrafinas, essa técnica é vantajosa por envolver materiais simples para formar as multicamadas. Contudo, o objetivo de todas as técnicas é o mesmo: melhorar a superfície do implante a ser instalado, o que possibilita o processo de reparo ósseo diante de distúrbios sistêmicos (26-30).

Dentre as substâncias que atuam na melhora do tecido ósseo podemos citar a genisteína que evita a perda óssea massiva na deficiência de estrógeno. Sendo um fitoesterógeno, a genisteína tem semelhança estrutural com os estrógenos, tendo efeitos esterogênicos e antiestrogênicos, afetando de maneira positiva a saúde óssea e sintomas da pós-menopausa, além disso, a genisteína ainda tem potencial para prevenir a osteopenia e cardiopatias (31-35). Com seu uso crescendo na população e seus efeitos ósseos positivos se faz necessário mais estudos sobre sua relação com a osseointegração (36).

Outra biomolécula interessante na funcionalização do implante é a teriparatida, pois estudos do nosso grupo de pesquisa sobre a melhora da resposta reparacional durante a osseointegração (processo FAPESP nº 2017/08187-3) e em alvéolos pós-exodôntico de rato usando essa substância localmente mostraram efeitos positivos de neoformação e reconstrução óssea (37), contudo o uso de teriparatida local para o tratamento da osteonecrose permanece relativamente recente e faltam evidências de sua eficácia (38).

Assim, diante do exposto, esse estudo foi realizado para viabilizar e investigar a funcionalização da superfície dos implantes com as biomoléculas genisteína e teriparatida buscando reduzir as complicações presentes na instalação de implantes em pacientes osteoporóticos.

2 OBJETIVOS

Avaliar, por meio de análise biomecânica (torque de remoção) e análise molecular (RT-PCR) o desempenho de biomoléculas, teriparatida e genisteína, em diferentes concentrações em ratas que estejam em condição análoga à osteoporose e em ratas em condição de normalidade sistêmica.

3 METODOLOGIA

3.1 Experimentos *in vivo* com o Modelo Experimental proposto

Inicialmente o projeto foi enviado para Comitê de ética em pesquisa no uso de animais (CEUA: 00566-2019 e CEUA: 0034-2019) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e obteve parecer favorável (**Anexo A e B**). Desse modo, foram utilizadas 48 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, adultas (3 meses), com peso de médio de 300 gramas. A linha do tempo com os períodos operatórios está descrita na **Figura 1**.

Estes 48 animais foram divididos em 2 grupos: SHAM (n = 24): animais submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral e OVX (n = 24): animais submetidos à cirurgia de ovariectomia bilateral, então, sendo divididas em 3 subgrupos de acordo com a funcionalização do implante, com 8 animais cada, sendo CONV, GEN 100 mM e TERI 10 ng (**Tabela 1**).

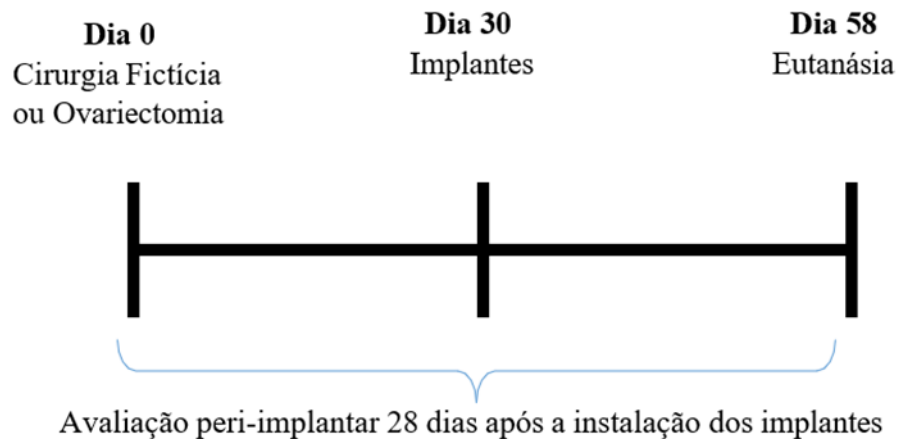
Tabela 1 - Delineamento dos grupos propostos

GRUPOS	TIPO DE IMPLANTE	N (por grupo)
SHAM	Convecional	8
	Gen 100 mM	8
	Teri 10 ng	8
OVX	Convecional	8
	Gen 100 mM	8
	Teri 10 ng	8
		Total de animais: 48

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

No dia zero foi realizada a cirurgia fictícia e ovarectomia bilateral, passados 30 dias os implantes foram instalados na metáfise proximal das tíbias direita e esquerda e após 28 os animais foram eutanasiados (**Figura 3**).

Figura 1 - Linha do tempo dos grupos experimentais SHAM e OVX



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.2 Ciclo estral

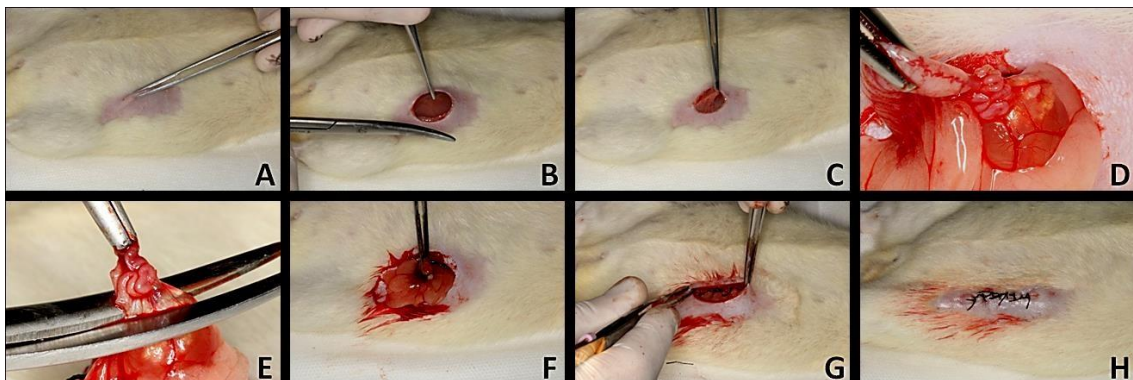
Para garantir que as ratas selecionadas para os experimentos estivessem ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e todos dias foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico e em seguida, aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata técnica de Long & Evans, 1922 (39) para reconhecimento das 4 fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares. Vale destacar que esta técnica foi utilizada novamente com o intuito de validar a cirurgia de ovariectomia bilateral realizada.

3.3 Cirurgia fictícia e de ovariectomia

Após a validação que as ratas ciclavam normalmente, no dia 0 as mesmas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia com a finalidade de induzir a deficiência de estrógeno. Sendo assim, as ratas dos grupos OVX CONV, OVX TERI 10 ng e OVX GEN 100 mM foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil.) e a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, foi realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Então foram

localizados os ovários e os cornos uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (*Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos*). Realizou-se a remoção dos ovários. Após a sutura por planos foi realizada com fio de Poliglactina 910 4.0 (*Vicryltm – Jhonson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos*) (**Figura 2**). Como medida profilática após a cirurgia, foi injetado 0,2 ml de um antibiótico veterinário (Penicilina com Estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular em todos os animais. As ratas do grupo SHAM passaram pelo mesmo estresse cirúrgico (cirurgia fictícia), no entanto, não tiveram os ovários e cornos uterinos removidos e laqueados.

Figura 2 - Sequência do transoperatório da cirurgia de ovariectomia



Fonte: Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados – Roberta Okamoto (2023)

Legenda: A: Região do flanco da rata tricotomizada; B: Corte e divulsão da mesma região envolvendo pele, tecido subcutâneo e músculo abdominal; C: Localização da gordura branca que envolve o ovário; D: Identificação do ovário e laqueamento do corno uterino; E: Remoção do ovário; F: Reposicionamento dos tecidos; G e H: Sutura por planos.

3.4 Funcionalização da superfície dos implantes

Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido, com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama. A superfície dos implantes dos subgrupos GEN e TERI foi funcionalizada pela técnica de *layer-by-layer*. Esta técnica consiste na imersão de um substrato sólido (geralmente com desequilíbrio de cargas em sua superfície) por um intervalo de tempo de 5 minutos numa solução aquosa contendo o material a ser depositado. A carga deste material deve ser contrária à do substrato para que haja atração eletrostática. Na sequência, o conjunto substrato mais monocamada foi

lavado para eliminar o excesso de material e seco. Em seguida, foi imerso numa solução contendo um outro material, agora de carga contrária à do material já depositado, e assim formar os filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares. O novo conjunto substrato mais bicamada é lavado e pode ser seco novamente em estufa à 60°C. Na funcionalização dos implantes foram empregados o eletrólito poliestireno sulfonado (PSS) com carga negativa, durante 5 minutos. Foi então feita a lavagem com água de estoque e os implantes foram imersos, durante 5 minutos, em solução eletrolítica de TiO₂ com carga positiva, preparada pelo método sol-gel. Após esta etapa fez-se a lavagem com água de estoque e enfim os implantes foram submersos em uma concentração de 10 ng de teriparatida para o grupo TERI ou 100 Mm de genisteína para o grupo GEN, e, ambos por 10 minutos. Passado este período de tempo foi feita a lavagem em água Milli-Q®. Entre todas as etapas realizou-se a secagem para se evitar a contaminação das soluções utilizadas. Estudos *in vitro* já concluídos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a concentração utilizada para a funcionalização dos implantes com a genisteína e a teriparatida é eficiente tanto para a manutenção da viabilidade celular quanto para a obtenção de resultados seguros com relação à genotoxicidade (processo FAPESP nº 2018/03114-0).

A funcionalização dos implantes com genisteína e teriparatida, nas concentrações utilizadas neste estudo, constam nas patentes depositadas no INPI sob registros BR 10 2021 019134 1 (genisteína) e BR 10 2021 019548 7 (teriparatida).

3.5 Cirurgia de instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias

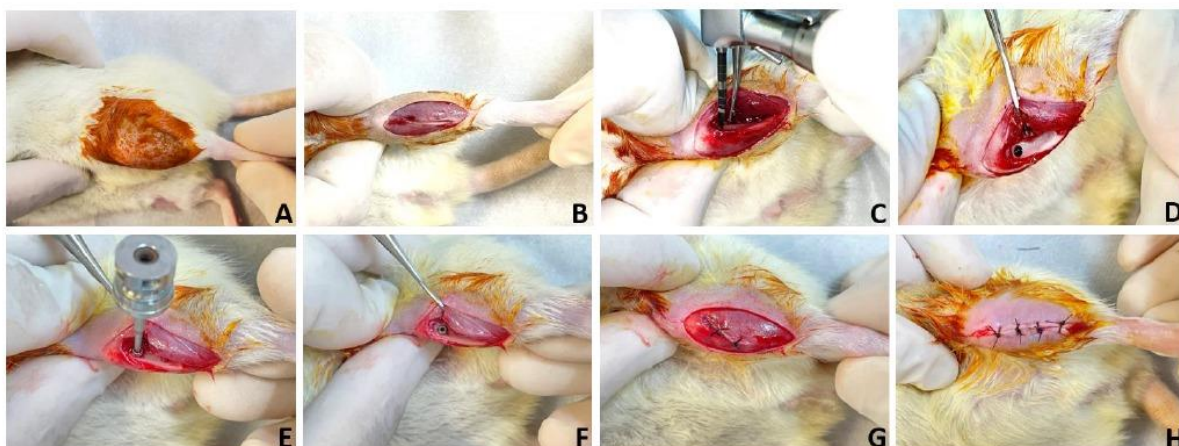
Decorridos 30 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral e cirurgia fictícia os animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes. Dessa forma, os animais foram mantidos em jejum durante as oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de 50mg/kg de cloridrato de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

Após a sedação foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, e a antisepsia da região a ser incisada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Com uma lâmina para bisturi número 15 (*Feather Industries* Ltda, Tóquio, Japão) foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise proximal da tíbia esquerda e da tíbia direita. A seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para a instalação do implante.

Foram instalados implantes de titânio comercialmente puro grau IV (n = 48) baseado no conceito de duplo ataque ácido, com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama, submetidos à funcionalização das superfícies com a genistenína ou a teriparatida. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,6 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; *Driller*, São Paulo, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, *KaVo®*, *Kaltenbach & Voigt GmbH & Co.*, *Biberach*, Alemanha) e profundidade de 2 mm, com travamento e estabilidade inicial.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise proximal da tíbia. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (**Figura 3**). 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, São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Figura 3 - Sequência do transoperatório do procedimento de instalação dos implantes



Fonte: Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados – Roberta Okamoto (2023)

Legenda: A: Antissepsia da região com PVPI na metáfise proximal da tíbia; B: Incisão linear na lateral da metáfise proximal da tíbia; C: Divulsão por planos, acesso à metáfise proximal da tíbia e fresagem; D: Leito ósseo fresado para a instalação do implante; E: Instalação do implante acoplado à chave digital; F: Implante feito; G e H: sutura por planos.

3.6 Eutanásia – 28 dias após a instalação dos implantes

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

Com o implante exposto (tíbia esquerda) foi conectado à chave do torquímetro digital a partir do hexágono do implante, realizando um movimento anti-

horário aumentando o torque de remoção até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, a fim de romper completamente o contato osso-implante. O dispositivo registrou o pico máximo de torque para esse rompimento em Newton por centímetro (N.cm).

Para a análise de PCR em tempo real após a remoção do implante (tíbia direita), o tecido ósseo reparacional foi removido com o auxílio de uma pinça goiva, lavado em solução de PBS, armazenado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80 °C.

3.7 Torque de remoção (análise biomecânica)

Após a anestesia, as tíbias foram acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Neodent, Ltda, Curitiba, PR, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante. Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registre o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm) e os valores obtidos foram agrupados.

3.8 Análise molecular (PCR em tempo real)

A reação de cadeia de polimerase em tempo real (PCR) foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão gênica relativa de marcadores relacionados ao processo de reparo ósseo ao redor dos implantes. Cada fragmento ósseo coletado foi cuidadosamente lavado em PBS e na sequência congelado em nitrogênio líquido para que o RNA total fosse extraído com o reagente Trizol (*Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos*). Após a análise da integridade, pureza e concentração do RNA, foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA através da reação de transcriptase reversa (M-MLV transcriptase reversa: *Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos*). Os cDNAs das amostras foram pipetados juntamente com o *Taqman Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems)* na placa para PCR (96 well fast thermal cycling, *Life Biotechnologies*)

para detecção de genes envolvido no processo de reparo ósseo (*Taqman Gene Expression Assays*). Os genes estudados foram: IBSP, ALP, OCN. O PCR em tempo real foi realizado em um sistema de detecção para PCR em tempo real *Step One Plus* (*Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pela curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à expressão das proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos ósseos coletados da região peri-implantar, nos diferentes períodos experimentais (método $\Delta\Delta CT$). O ensaio foi feito em quadruplicata.

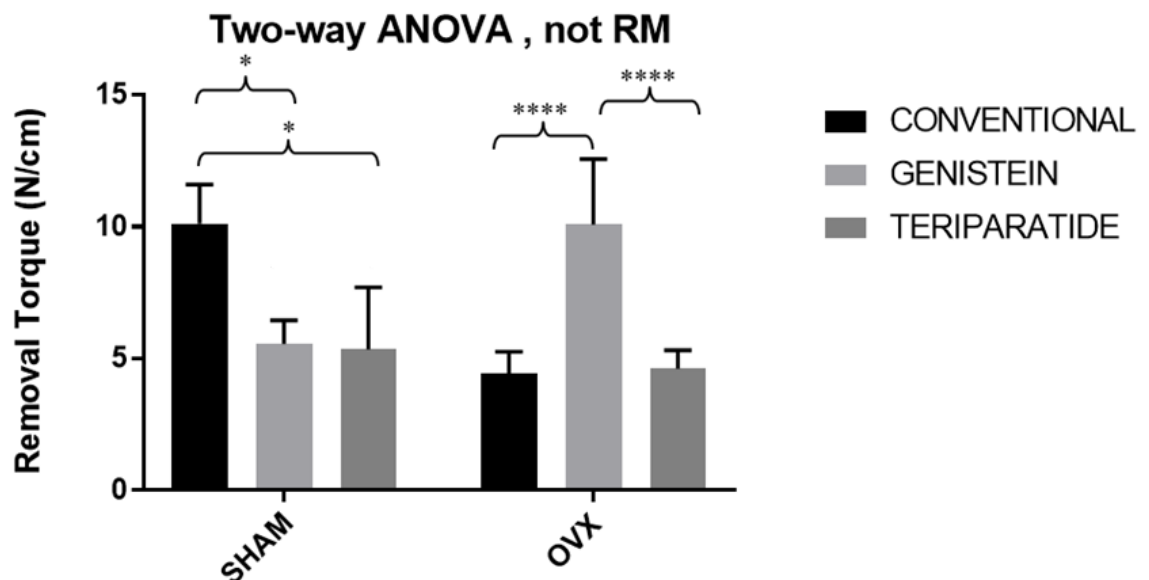
4 RESULTADOS

4.1 Torque de remoção

Os resultados referentes ao grupo OVX mostraram diferença estatística significativa na comparação dos grupos OVX CONV vs. OVX GEN (100 mM), assim como na comparação dos grupos OVX TERI (10 ng) vs. OVX GEN (100 mM), onde em todos cenários a genisteína mostrou um melhor resultado em N/cm no torque de remoção dos implantes (**Figura 4**).

Na comparação entre os resultados no grupo SHAM notamos que houve diferença estatística significativa na comparação dos grupos SHAM CONV vs. SHAM GEN (100 mM) e na comparação dos grupos SHAM CONV vs. SHAM TERI (10 ng), com resultados semelhantes para as duas biomoléculas e com o CONV tendo melhores resultados (**Figura 4**).

Figura 4 - Análise estatística do torque de remoção (análise biomecânica) dos grupos SHAM e OVX, $p < 0,05$, ANOVA two-way

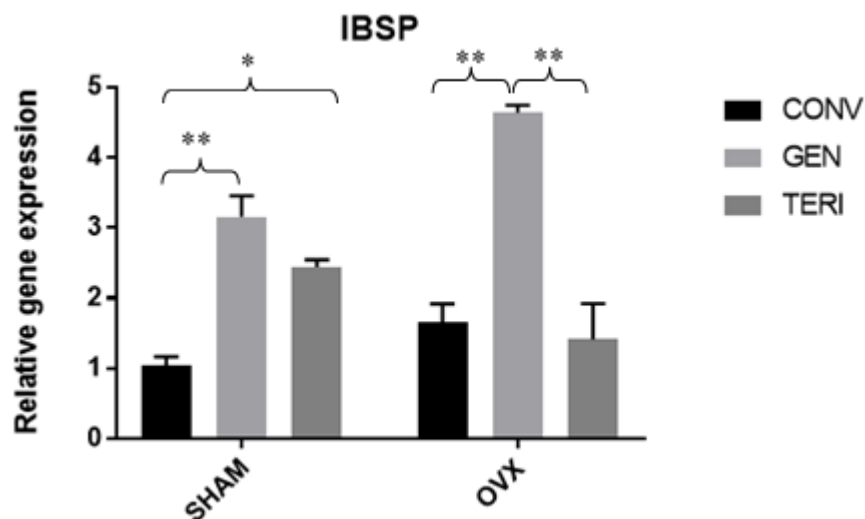


Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

4.2 Análise da expressão gênica relativa (RT-PCR)

Os resultados da análise da molecular mostraram que a expressão relativa do gene IBSP foi maior para os implantes funcionalizados com genisteína (SHAM e OVX). No grupo SHAM notamos diferença significativa entre SHAM CONV vs. SHAM GEN (100 mM) e entre SHAM CONV vs. SHAM TERI (10 ng). Enquanto para o grupo OVX houve diferença estatística na comparação entre os grupos OVX CONV e OVX TERI (10 ng) vs. OVX GEN (100 mM) (**Figura 5**).

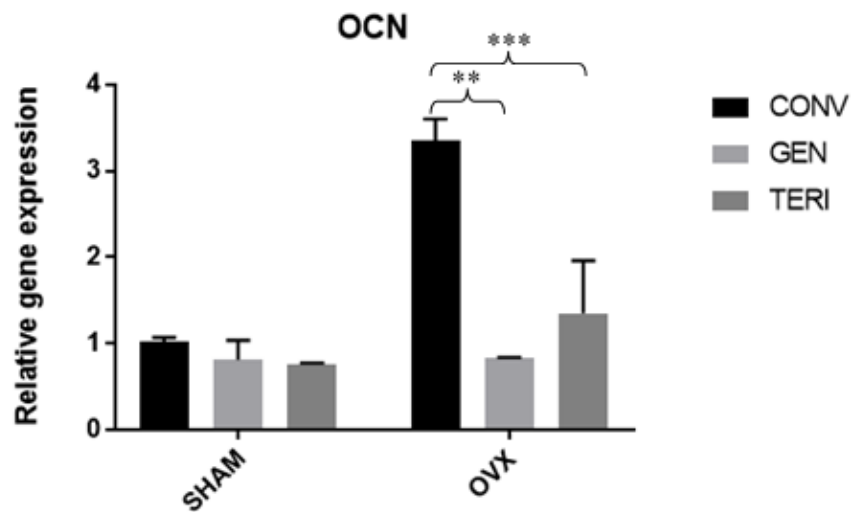
Figura 5 - Análise estatística da expressão relativa do gene IBSP dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Na análise do gene OCN não houve diferença estatística significativa nos resultados do grupo SHAM, contudo no grupo OVX tanto TERI (10 ng) quanto GEN (100 mM) apresentaram valores inferiores ao CONV, notando diferença estatística na comparação destes grupos (**Figura 6**).

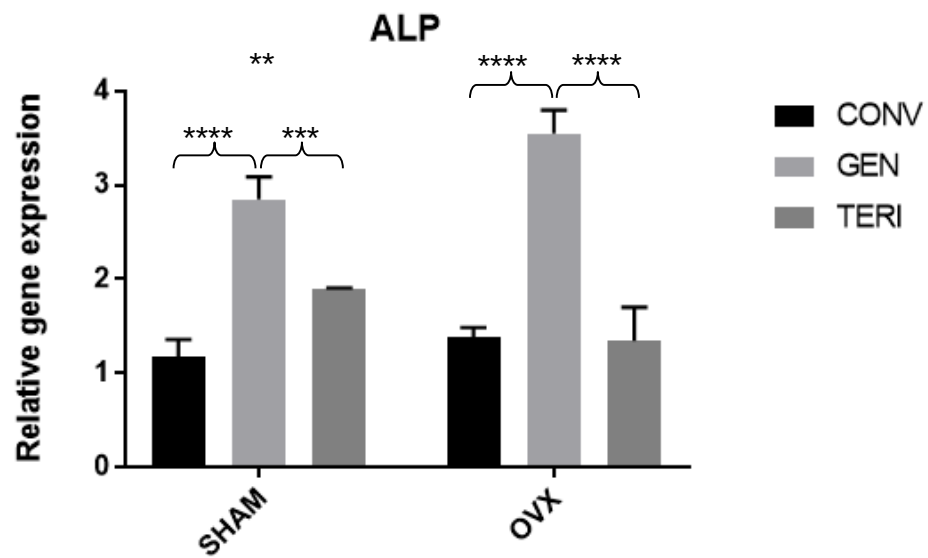
Figura 6 - Análise estatística da expressão relativa do gene OCN dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Ao analisar a expressão relativa do gene ALP observamos novamente maior expressão deste gene para os implantes tratados com genisteína, no qual, para o grupo SHAM tivemos diferença para todos subgrupos, com maiores discrepâncias nas comparações com o grupo GEN (100 mM) e para o grupo OVX as diferenças foram entre o grupo GEN (100 mM) vs. CONV e entre GEN (100 mM) vs. TERI (10 ng) (**Figura 7**).

Figura 7 - Análise estatística da expressão relativa do gene ALP dos grupos OVX e SHAM, $p < 0,05$, ANOVA two-way



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

5 DISCUSSÃO

Os tratamentos de superfícies dos implantes surgem como uma alternativa de melhorar a resposta reparacional peri-implantar, frente a desordens metabólicas ósseas, como a osteoporose, onde há prejuízo do reparo (26-30). Além disso, os fármacos de tratamento (bifosfonatos) apresentam efeitos adversos de importância odontológica como a osteonecrose de ossos da face (16), a funcionalização dos implantes ajuda de maneira local, sem precisar cessar o uso desses medicamentos que atuam no tratamento da osteoporose.

Nesse estudo investigamos a funcionalização da superfície de implantes com as biomoléculas genisteína e teriparatida, instalados em tíbia de ratas osteopênicas, com o objetivo de promover a melhora do reparo peri-implantar a partir da atuação destas sobre as respostas celulares e eventos reparacionais. O presente trabalho demonstrou que a funcionalização com genisteína promoveu melhores respostas em comparação à teriparatida ou a superfície convencional não tratada.

A análise dos dados obtidos referentes ao torque de remoção, observamos que as ratas do grupo OVX, que receberam o implante funcionalizado com genisteína, apresentaram valores superiores de torque de remoção do que os subgrupos TERI e CONV, sendo que estes últimos apresentaram resultados semelhantes entre si. Contudo, no grupo SHAM o implante convencional obteve desempenho superior aos animais com implantes funcionalizados. Estes achados sugerem que a genisteína local apresentou melhor desempenho na resposta reparacional peri-implantar, tendo efeito ósseo-protetor no animal ovariectomizado melhorando as propriedades mecânicas do osso, de forma a reforçar os resultados de Miao *et al.* (40).

Na análise molecular (RT-PCR) quanto ao gene IBSP, responsável pelo efeito osteogênico e de diferenciação de células precursoras da medula óssea em osteoblastos durante o processo de reparo ósseo (41), foi observado que a expressão gênica relativa foi aumentada nos implantes funcionalizados tanto com teriparatida quanto genisteína, tendo a última um maior destaque, principalmente para o grupo OVX. Além disso, o grupo OVX TERI teve desempenho semelhante ao grupo convencional. Esse resultado corrobora com os observados no torque de remoção, sendo que a genisteína promoveu um efeito significativo sobre a

expressão de genes relacionados ao processo de mineralização/osteogênico em animais osteopênicos, como também foi observado por Anastasio *et al.* (42).

Quanto ao gene OCN (osteocalcina), que é um marcador de fase tardia de diferenciação de osteoblastos, associado à mineralização aumentada por sua capacidade para se ligar cálcio, observou-se que a funcionalização das superfícies não influenciou sua expressão em nenhum grupo, obtendo resultados significativos apenas para o grupo OVX CONV. Vale destacar que a osteocalcina é uma proteína de mineralização que começa a apresentar sua atividade crescente a partir dos 14 dias pós-operatórios. A expressão do gene osteocalcina aumentada aos 28 dias pode mostrar um atraso na sinalização para a expressão desta proteína e seu efeito sobre o reparo ósseo no grupo experimental em questão. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram prejuízo na imunomarcagem de osteocalcina durante o processo de reparo alveolar na condição de ovariectomia e que esta retorna ao padrão de normalidade numa etapa mais tardia quando comparado ao grupo sham/condições homeostáticas (43).

Por fim, observamos também um maior destaque na expressão do gene ALP para todos grupos funcionalizados com genisteína, gene ligado à atividade osteoblástica, ao processo de mineralização bem como à melhor qualidade do cristal de hidroxiapatita em formação (43). No grupo SHAM a teriparatida se mostrou melhor que o grupo CONV, em contrapartida o grupo OVX apresentou resultados semelhantes ao grupo CONV.

Através das análises vemos que a genisteína teve desempenho superior em relação às outras superfícies funcionalizada com teriparatida e convencional. No torque de remoção teve bons resultados para o grupo com comprometimento sistêmico e na análise molecular notamos que apesar da teriparatida ter apresentado resultados positivos, a genisteína foi mais eficaz em ambos grupos OVX e SHAM.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir, embasado nas análises realizadas neste estudo, que a genisteína é uma biomolécula que estimula melhor o reparo peri-implantar em comparação as superfícies funcionalizadas com teriparatida ou convencional. Dessa forma, a genisteína mostrou melhor eficiência na osseointegração de implantes de titânio em animais com comprometimento sistêmico (deficiência de estrógeno).

REFERÊNCIAS

1. TELLA, S.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155-170, 2014.
2. HARVEY, N.; DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoporosis: impact on health and economics. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 2, p. 99-105, 2010.
3. FU, S. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, v. 34, n. 6, p. 467-477, 2014.
4. GIUSTI, A.; BIANCHI, G. Treatment of primary osteoporosis in men. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2015, p. 105-115, 2015.
5. INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. **Facts and statistics about osteoporosis and its implications**. 2009. Disponível em: www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html. Acesso em: 12 mar. 2024.
6. EASTELL, R. *et al.* Postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2016.
7. CAUBLE, M. A. *et al.* Estrogen depletion and drug treatment alter the microstructure of type I collagen in bone. **Bone Reports**, v. 5, p. 243-251, 2016.
8. SZULC, P. *et al.* Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 12, p. 1856-1863, 2006.
9. PAYNE, J. B. *et al.* The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 68, n. 1, p. 24-31, 1997.
10. GIRO, G. *et al.* Impact of osteoporosis in dental implants: a systematic review. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 2, p. 311, 2015.
11. MÜLLER, F. Interventions for edentate elders—what is the evidence? **Gerodontology**, v. 31, p. 44-51, 2014.
12. RUPP, F. *et al.* Surface characteristics of dental implants: a review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 40-57, 2018.
13. CHIAPASCO, M. *et al.* Evaluation of peri-implant bone resorption around Straumann Bone Level implants placed in areas reconstructed with autogenous vertical onlay bone grafts. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 9, p. 1012-1021, 2012.

14. BRANEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. **Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985.
15. BACCARO, L. F. *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583-591, 2015.
16. RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, 2014.
17. FANTI, P. *et al.* The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 8, p. 274-281, 1998.
18. JEON, Y. K. *et al.* Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre-and postmenopausal women. **Endocrine Journal**, v. 58, n. 2, p. 87-93, 2011.
19. MALAVASI, M. *et al.* Effects of risedronate on osteoblastic cell cultures. **Archives of Oral Biology**, v. 68, p. 43-47, 2016.
20. RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 6, p. 798-805, 2015.
21. LUVIZUTO, E. R. *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**, v. 55, n. 1, p. 52-59, 2010.
22. DELMAS, P. D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Lancet**, v. 359, n. 9322, p. 2018-2026, 2002.
23. TROVAS, G. P. *et al.* A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in men with idiopathic osteoporosis: effects on bone mineral density and bone markers. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 521-527, 2002.
24. OLIVEIRA, J. H. A. *et al.* Teriparatida (PTH [1-34] rh): uma nova perspectiva no tratamento da osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, p. 184-189, 2003.
25. ANDREWS, E. B. *et al.* The US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: study design and findings from the first 7 years. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 12, p. 2429-2437, 2012.
26. ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. On osseointegration in relation to implant surfaces. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, p. 4-7, 2019.

27. SMEETS, R. *et al.* Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 6285620, 2016.
28. MARENZI, G. *et al.* Effect of different surface treatments on titanium dental implant micro-morphology. **Materials**, v. 12, n. 5, p. 733, 2019.
29. BARFEIE, A.; WILSON, J.; REES, J. Implant surface characteristics and their effect on osseointegration. **British Dental Journal**, v. 218, n. 5, p. E9, 2015.
30. SHI, Q. *et al.* Surface modification of dental titanium implant by layer-by-layer electrostatic self-assembly. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 574, 2017.
31. FANTI, P. *et al.* The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 8, p. 274-281, 1998.
32. WEI, H. *et al.* Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3811S-3819S, 2003.
33. POLKOWSKI, K.; MAZUREK, A. P. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 57, n. 2, p. 135-155, 2000.
34. ATTERITANO, M. *et al.* Genistein effects on quality of life and depression symptoms in osteopenic postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, controlled study. **Osteoporosis International**, v. 25, p. 1123-1129, 2014.
35. BITTO, A. *et al.* Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 6, p. 896-905, 2008.
36. ERTEN TAYSI, A. *et al.* The efficacy of sustained-release chitosan microspheres containing recombinant human parathyroid hormone on MRONJ. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. e086, 2019.
37. FRIGÉRIO, P. B. *et al.* Effect of topical PTH 1-34 functionalized to biogran® in the process of alveolar repair in rats submitted to orchietomy. **Materials**, v. 15, n. 1, p. 207, 2021.
38. KUROSHIMA, S. *et al.* Intra-oral PTH administration promotes tooth extraction socket healing. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 6, p. 553-559, 2013.
39. LONG, J. A.; EVANS, H. M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley: University of California Press, 1922.
40. MIAO, Q. *et al.* The bone-protective effect of genistein in the animal model of bilateral ovariectomy: roles of phytoestrogens and PTH/PTHR1 against post-menopausal osteoporosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 56-70, 2011.

41. MIZUNO, M. *et al.* Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. **Calcified Tissue International**, v. 66, p. 388-396, 2000.
42. ANASTASIO, A. T. *et al.* Nanomaterial nitric oxide delivery in traumatic orthopedic regenerative medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 592008, 2021.
43. LUVIZUTO, E. R. *et al.* Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1021-1029, 2010.

ANEXOS

Anexo A - Comitê de ética em pesquisa no uso de animais (CEUA)



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 do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrogênio e síndrome metabólica"**, Processo FOA nº 00566-2019, 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 12 de Novembro de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 12 de Outubro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 12 de Novembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the synergistic effect between systemic Risedronate and local genistein on peri-implant repair in estrogen deficient rats and metabolic syndrome"**, Protocol FOA nº 00566-2019, 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 November 12, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 12, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 12, 2020.

Profa. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Anexo B - Comitê de ética em pesquisa no uso de animais (CEUA)



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 do reparo ósseo após a instalação de implantes funcionalizados com medicação anabólica associada à administração sistêmica de antireabsortivo em ratas com deficiência de estrogênio e síndrome metabólica"**, Processo FOA nº 00434-2019, 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 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Julho de 2021.

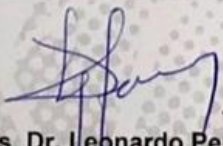
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Agosto de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of bone repair after the installation of functionalized implants with anabolic medication associated with systemic administration of antiresorptive in estrogen deficient rats and metabolic syndrome"**, Protocol FOA nº 00434-2019, 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 July 30, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 30, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 30, 2021.



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

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