

NATHÁLIA DANTAS DUARTE

**Avaliação do reparo ósseo após a utilização de substitutos
ósseos funcionalizados por genisteína no preenchimento
de defeitos peri-implantares: estudo pré-clínico em ratas
ovariectomizadas**

**Araçatuba – SP
2024**

NATHÁLIA DANTAS DUARTE

**Avaliação do reparo ósseo após a utilização de substitutos
ósseos funcionalizados por genisteína no preenchimento
de defeitos peri-implantares: estudo pré-clínico em ratas
ovariectomizadas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Implantodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique
Silva Gomes-Ferreira

**Araçatuba – SP
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D812a Duarte, Nathália Dantas.
Avaliação do reparo ósseo após a utilização de substitutos ósseos funcionalizados por genisteína no preenchimento de defeitos peri-implantares: estudo pré-clínico em ratas ovariectomizadas / Nathália Dantas Duarte. – Araçatuba, 2024
68 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Pedro Henrique Silva Gomes-Ferreira

1. Materiais biocompatíveis 2. Genisteína 3. Estrogênios
4. Osseointegração I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Aos meus pais, **Ubaldo Antônio Duarte e Khelman Cristina Mariano Dantas Duarte**, não há palavras para expressar minha gratidão por ter pais tão maravilhosos como vocês. O amor incondicional é minha maior força e o apoio inabalável é meu porto seguro. Pai, você é um grande profissional e fonte de inspiração, sempre exerceu a Odontologia com responsabilidade e respeito, prezando sempre pela saúde à frente da estética. Mãe, além da sua dedicação ao trabalho, admiro o seu carinho e cuidado por mim, obrigada por estar presente e me amparar em momentos difíceis. Dedico a vocês tudo que sou e tudo que conquistei, pois nada disso seria possível sem o esforço de vocês para realizar esse sonho, que também se tornou o sonho de vocês.

Aos meus avós paternos, **Antônio José Duarte e Bemvinda Divina Duarte** e, avós maternos, **João Geraldo Dantas e Yolanda Mariano Dantas**, que me ensinaram valores importantes por toda a vida, serão sempre meus maiores exemplos de fé, sabedoria, bondade e humildade.

Agradecimientos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, pelo dom da vida, sabedoria e bençãos concedidas em todas as etapas de minha vida. Sou grata por me permitir viver o teu propósito e ter me dado forças e fé nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais, **Ubaldo Antônio Duarte e Khelman Cristina Mariano Dantas Duarte**, agradeço novamente por todo amor e confiança em mim depositada. Amo muito vocês.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, agradeço a oportunidade, acolhimento e confiança em me escolher como orientada. Pois, além de ter me graduado em outra Universidade, sai da faculdade com pouca experiência científica e laboratorial. E, após aprovação no Mestrado na FOA/UNESP e saber que iria ser sua orientada, foi uma surpresa e felicidade inexplicável. Admiro muito o seu trabalho, conhecimento, inteligência e carinho com todos nós do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados (LSMT). Além disso, admiro por ser solícita e um ser humano com o coração enorme, sempre fazendo questão de mostrar o nosso grupo de pesquisa em congressos e nos oferecendo grandes oportunidades de crescimento acadêmico. É uma honra fazer parte do LSMT e aprender diariamente com a senhora. Muito obrigada por tudo!

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Pedro Henrique Silva Gomes-Ferreira**, agradeço a coorientação e contribuição neste estudo. Pedro, admiro sua trajetória acadêmica, me identifico com sua história e, saiba que se tornou um grande amigo.

Ao **Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa-Filho**, agradeço a disponibilidade e auxílio em me receber no Laboratório de Materiais Avançados e Nanotecnologia do Departamento de Física da Faculdade de Ciências de Bauru – UNESP, para o desenvolvimento de importante parte deste estudo.

Aos Membros da Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, admiro o senhor pelo seu trabalho assim como pela sua pessoa. Obrigada por cada conhecimento transmitido e agradeço a amizade e convívio.

Prof. Dr. Michel Reis Messora, meu professor da Especialização em Periodontia da FORP/USP, admiro o senhor por sua trajetória acadêmica e por sempre prezar a excelência clínica baseada em evidências científicas.

Às **amigas do LSMT**, mestrandas Laura Vidoto Paludetto e Tatiany Aparecida de Castro. E, doutorandas, Juliana de Moura, Paula Buzo Frigério, Isadora Breseghello, Naara Gabriela Monteiro, Letícia Pitol Palin e Ana Cláudia Ervolino da Silva. Agradeço todas vocês pela disponibilidade e ajuda durante a execução deste estudo. Obrigada por cada ensinamento compartilhado e boa convivência diária.

Aos **alunos de Iniciação Científica do LSMT**, em especial, à aluna **Marcelly Braga Gomes**, agradeço por toda ajuda, empenho e dedicação ao longo do Mestrado. Fico feliz por sempre estar disposta a aprender e, orgulhosa em ver seu crescimento a cada dia. Você vai longe!

Ao meu amigo da Pós-Graduação em Periodontia, **Otávio Augusto Pacheco Vitória**, agradeço o carinho e acolhimento desde o processo seletivo para ingressar no Mestrado e amizade cultivada ao longo desta jornada.

Às minhas amigas da Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial e Implantodontia, em especial, **Laura Vidoto Paludetto**, **Juliana de Moura** e **Paula Buzo Frigério**, agradeço por cada momento e experiência compartilhada. Obrigada por sempre me apoiarem.

Ao meu namorado, **Cleber Davi Del Rei**, agradeço o companheirismo e incentivo à realizar meus sonhos. A convivência com você torna minha rotina mais leve.

Aos meus **familiares**, agradeço por todo apoio, carinho e orações.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção**.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pela paciência e disponibilidade em todas as etapas do Mestrado.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pela dedicação e prontidão em nos atender.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, Código de Financiamento 001.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Mestrado durante onze meses (Processo: 88887.674377/2022-00).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo: 2022/07158-8).

À **Titaniumfix®**, pelo fornecimento dos implantes osseointegráveis utilizados neste estudo.

Ao **Laboratório Multiusuário da FOA/UNESP** e à **FINEP** (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) por fornecer o microtomógrafo SkyScan 1272 (Bruker) para escaneamento e reconstrução das peças amostrais.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo acolhimento e por viabilizar a execução de todas as etapas deste estudo. Agradeço aos professores da Disciplina de Histologia e Embriologia (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, Profa. Dra. Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos professores da Disciplina de Anatomia (Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Profa. Dra. Roberta Okamoto), aos funcionários e todos os outros estagiários.

Aos **professores** da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Profa. Dra. Alessandra Aranega, Profa. Dra. Ana Paula Bassi, Profa. Dra. Daniela Ponzoni, e Prof. Dr. Leonardo Peres Faverani) pelos ensinamentos teóricos e práticos ao longo do Mestrado.

Aos **colegas** do programa de pós graduação em Odontologia, em especial, às áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Implantodontia e Periodontia.

Agradeço a todos pelo apoio e torcida ao longo dessa jornada e aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste sonho.

Epígrafe

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Skłodowska Curie

Resumo

DUARTE, N. D. Avaliação do reparo ósseo após a utilização de substitutos ósseos funcionalizados por genisteína no preenchimento de defeitos peri-implantares: estudo pré-clínico em ratas ovariectomizadas. 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar o desempenho da biomolécula genisteína incorporada ao Biogran[®], Bio-Oss[®] e Cerabone[®], através da técnica de sonoquímica no defeito ósseo peri-implantar em tibia de ratas ovariectomizadas. 70 ratas foram divididas nos seguintes grupos: 'CLOT' – controle negativo; 'BGN' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Biogran[®] in natura; 'BG+GEN' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Biogran[®] funcionalizado com genisteína através da sonoquímica; 'BON' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Bio-Oss[®] in natura; 'BO+GEN' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Bio-Oss[®] funcionalizado com genisteína através da sonoquímica; 'CERN' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Cerabone[®] in natura; 'CER+GEN' – defeito ósseo peri-implantar preenchido com Cerabone[®] funcionalizado com genisteína através da sonoquímica. A eutanásia ocorreu 28 dias após a cirurgia de instalação dos implantes. O torque reverso foi realizado para avaliar o valor máximo alcançado na remoção do implante do leito ósseo. Enquanto a análise microtomográfica avaliou a microarquitetura do tecido ósseo peri-implantar. Através do torque reverso de remoção, foi observado uma melhora no processo de reparo ósseo nos grupos BG+GEN e BO+GEN, em contrapartida, o grupo CER+GEN não mostrou diferença estatística quando comparado ao Cerabone[®] in natura. As respostas referentes a microarquitetura óssea provenientes do Micro-CT demonstraram que a funcionalização com genisteína do Biogran[®] e Bio-Oss[®] proporcionou melhorias morfométricas significativas. A genisteína associada ao Biogran[®] e Bio-Oss[®] em ratas com deficiência de estrógeno otimizou o processo de reparo ósseo peri-implantar. Entretanto, o genisteína incorporada ao Cerabone[®] não obteve benefícios.

Palavras-chave: Biomaterial. Genisteína. Estrógeno. Osseointegração.

Abstract

DUARTE, N. D. Evaluation of bone repair after using bone substitutes functionalized by genistein to fill peri-implant bone defects: preclinical study in ovariectomized rats. 2024. Master's Degree (Dissertation) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the performance of the genistein biomolecule incorporated into Biogran[®], Bio-Oss[®] and Cerabone[®], through the sonochemical technique in peri-implant bone defect in the tibia of ovariectomized rats. 70 rats were divided into the following groups: 'CLOT' – negative control; 'BGN' – peri-implant bone defect filled with Biogran[®] in natura; 'BG+GEN' – peri-implant bone defect filled with Biogran[®] functionalized with genistein through sonochemistry; 'BON' – peri-implant bone defect filled with Bio-Oss[®] in natura; 'BO+GEN' – peri-implant bone defect filled with Bio-Oss[®] functionalized with genistein through sonochemistry; 'CERN' – peri-implant bone defect filled with Cerabone[®] in natura; 'CER+GEN' – peri-implant bone defect filled with Cerabone[®] functionalized with genistein through sonochemistry. Euthanasia occurred 28 days after the implant installation surgery. Reverse torque was performed to evaluate the maximum value achieved when removing the implant from the bone. While microtomographic analysis evaluated the microarchitecture of the peri-implant bone tissue. Through the reverse removal torque, an improvement in the bone repair process was observed in the BG+GEN and BO+GEN groups, on the other hand, the CER+GEN group showed no statistical difference when compared to Cerabone[®] in natura. About the bone microarchitecture responses from Micro-CT demonstrated that the functionalization with genistein of Biogran[®] and Bio-Oss[®] provided significant morphometric improvements. Genistein associated with Biogran[®] and Bio-Oss[®] in estrogen-deficient rats optimized the peri-implant bone repair process. However, the genistein incorporated into Cerabone[®] did not provide benefits.

Keywords: Biomaterial. Genistein. Estrogen. Osseointegration.

Lísta de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica da sonoquímica	40
Figura 2 – Protocolo utilizado na sonoquímica	40
Figura 3 – Secagem das amostras	41
Figura 4 – Protocolo cirúrgico de ovariectomia bilateral	44
Figura 5 – Esquema demonstrando a instalação dos implantes nos grupos experimentais	46
Figura 6 – Protocolo cirúrgico de confecção do defeito peri-implantar e instalação dos implantes	47
Figura 7 – Biomaterial preenchendo o defeito peri-implantar	48
Figura 8 – Linha do tempo experimental	48
Figura 9 – Reconstrução 3D dos grupos in natura. BGN, BON, CERN	60
Figura 10 – Reconstrução 3D dos grupos funcionalizados com genisteína. BG+GEN, BO+GEN, CER+GEN	60

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais de acordo com o teste do biomaterial e número de animais	43
Tabela 2 – Grupos com diferença estatística ANOVA one way ($p < 0,05$). Comparação entre os grupos CLOT, BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN	53
Tabela 3 – Grupos com diferença estatística ANOVA two way ($p < 0,05$). Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN	54
Tabela 4 – BV: Grupos sem diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	55
Tabela 5 – BV/TV: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	55
Tabela 6 – Tb.Th: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	56
Tabela 7 – Tb.N: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	57
Tabela 8 – Tb.Sp: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	58
Tabela 9 – IS: Grupos sem diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER	59

Lista de gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos CLOT, BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN	52
Gráfico 2 - Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos com interferência da genisteína	53
Gráfico 3 – Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	54
Gráfico 4 – Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	55
Gráfico 5 – Quantificação da espessura trabecular. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	56
Gráfico 6 – Quantificação de número de trabéculas. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	57
Gráfico 7 – Quantificação da separação entre trabéculas. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	58
Gráfico 8 – Quantificação da superfície de intersecção. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN	59

Lísta de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

-	Negativo
%	Porcentagem
+	Positivo
<	Menor
=	Igual
°C	Graus
a	Altura
CAPES	Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FC	Faculdade de Ciências
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	Gramas
kHz	Quilohertz
LSMT	Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/kg/dia	Miligramas por quilograma por dia
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
nm	Nanômetro
N.cm	Newton por Centímetro
n°	Número
OVX	Ovariectomia
PVPI	Polivinilpirrolidona-Iodo
r ²	Raio ao quadrado
rpm	Rotação por minuto
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UV	Ultravioleta

V	Volume
W	Watts
α	Alfa
β	Beta
μM	Micrômetro
π	Pi

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVO	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Biomateriais a serem avaliados no estudo	38
3.1.1 Biogran® (Zimmer Biomet)	38
3.1.2 Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials)	38
3.1.3 Cerabone® (Straumann)	38
3.2 Redução à escala nanométrica dos biomateriais	38
3.3 Animais (in vivo)	41
3.3.1 Número amostral e delineamento experimental	41
3.3.2 Ciclo estral	43
3.3.3 Ovariectomia bilateral	43
3.3.4 Esterilização e pesagem dos biomateriais pré-cirúrgico	45
3.3.5 Cirurgia de confecção do defeito peri-implantar e instalação dos implantes	45
3.4 Análises realizadas	49
3.4.1 Análise Biomecânica (contra-torque)	49
3.4.2 Análise Microtomográfica (Micro-CT)	49
3.4.3 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS	52
4.1 Resultados Biomecânicos (contra-torque)	52
4.2 Resultados Microtomográficos (Micro-CT)	54
4.2.1 Volume Ósseo (BV)	54
4.2.2 Percentual de Volume Ósseo (BV/TV)	55
4.2.3 Espessura Trabecular (Tb.Th)	56
4.2.4 Número de Trabéculas (Tb.N)	56
4.2.5 Separação entre Trabéculas (Tb.Sp)	57
4.2.6 Superfície de Intersecção (IS)	58
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	76

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em 1969, Branemårk e colaboradores foram pioneiros ao relatar o fenômeno da formação óssea diretamente em contato com a superfície de um implante de titânio. Esse processo foi denominado osseointegração, sendo uma conexão direta, em magnitude microscópica, entre o osso vital organizado e a superfície de um implante submetido a carga funcional^{1,2}.

A Reabilitação Oral atingiu uma alta previsibilidade em seus tratamentos desde a descoberta da osseointegração. O reestabelecimento da estética e função da cavidade oral com implantes osseointegráveis é um método moderno de tratamento para pacientes edêntulos parciais ou totais³. Para o sucesso da osseointegração, é necessário a biocompatibilidade do material, macrogeometria e microgeometria do implante, protocolo cirúrgico controlado, quantidade e qualidade óssea favorável, além da aplicação adequada da carga mastigatória⁴.

Na clínica odontológica, comumente pacientes que apresentam comprometimento sistêmico buscam a reabilitação oral com implantes osseointegráveis, porém, podem não apresentar quantidade óssea favorável, sendo um desafio para o cirurgião-dentista no momento da instalação de implantes, devido às áreas de atrofia óssea presentes na cavidade oral⁵. Portanto, os substitutos ósseos são uma excelente alternativa para o tratamento da reconstrução do rebordo atrófico, além de ser uma terapia complementar durante o trans operatório para o preenchimento de defeitos ósseos peri-implantares, o que possibilita um volume ósseo adequado para a terapia com implantes osseointegráveis e, contribui para o sucesso clínico⁶.

O desenvolvimento tecnológico dos substitutos ósseos está associado ao avanço dos estudos acerca da biologia do metabolismo ósseo, assim, é possível influenciar seletivamente a qualidade e quantidade da formação do tecido ósseo. Desse modo, é importante o conhecimento a respeito do potencial biológico de cada material para correta indicação clínica.

Quanto à origem, os substitutos ósseos são classificados em: autógeno ou autólogo, homogêneo ou homólogo, heterogêneo ou xenógeno, sintético ou aloplástico^{7,8}. É importante o conhecimento a respeito das propriedades biológicas e, todos os biomateriais, independente da classificação quanto à origem, são

biocompatíveis e osteocondutores. Essas características referem-se à compatibilidade com tecidos vivos, por não haver toxicidade. A propriedade osteocondutora permite a aposição de osteoblastos em sua superfície e para isso, requer a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras⁹.

Entre as opções de materiais aloplásticos, o Biogran® (Zimmer Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, USA), é composto por vidro bioativo sintético e não possui potencial imunogênico. É um biomaterial osteocondutor, estimula a produção de células osteogênicas para formação óssea, atua como centros de calcificação para a reparação óssea, possui fácil manipulação e proporciona excelente hemostasia. Além disso, a utilização de um biomaterial aloplástico pode ser enxertado em defeitos ósseos para promover a osseointegração de implantes e a preservação da altura do osso alveolar¹⁰⁻¹³.

Biomateriais heterógenos, como o Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) é caracterizado por ser um enxerto ósseo anorgânico, de origem bovina australiana, que, segundo as diretrizes da União Europeia é seguro em relação à Encefalite Espongiforme Bovina – BSE. Seus grânulos possuem morfologia óssea semelhante ao osso humano e, os macroporos favorecem a vascularização, além de otimizar a quimiotaxia e permitir a aposição de osteoblastos. Devido a essas características, o Bio-Oss® é considerado “gold standard” nos procedimentos de reconstruções ósseas¹⁴⁻¹⁸.

Também bastante utilizado no cotidiano clínico, o Cerabone® (Straumann, Basel, Switzerland) é outro exemplo de biomaterial heterógeno indicado para preservação do rebordo alveolar. É produzido através do osso trabecular bovino, ocorre uma remoção térmica do componente orgânico ósseo, preservando uma matriz extracelular residual composta apenas por hidroxiapatita de cálcio¹⁹⁻²².

Contudo, um substituto ósseo com propriedades ideais ainda persiste como um desafio na Implantodontia, principalmente quando utilizado em pacientes com comprometimento sistêmico, o que torna o planejamento cirúrgico mais complexo e o prognóstico menos favorável. Sendo necessário a funcionalização dos biomateriais com biomoléculas para melhorar as propriedades biológicas dos substitutos ósseos e otimizar os resultados clínicos^{8,23}.

No tecido ósseo, as células da linhagem de osteoblastos são grupos que incluem células mesenquimais, pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, células de revestimento ósseo e osteócitos. Os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea e são essenciais na manutenção da homeostase óssea, que é controlada por uma série de hormônios^{24,25}.

A presença de receptores estrogênicos em osteoblastos foi descrita por Eriksen e colaboradores em 1988, que detectaram a presença de RNA mensageiro (RNAm) estrogênico em osteoblastos, ou seja, receptores de estrógeno (ER α) nessas células.

Os níveis adequados de estrógeno, hormônio esteroide sintetizado pelos ovários, é fundamental para o processo de formação óssea e manutenção de massa óssea²⁶⁻²⁸. Existem evidências de que a diminuição ou ausência de estrógeno leva a progressiva redução da massa óssea. Nessa condição, observa-se a instalação da osteopenia na qual pode progredir para osteoporose, condição severa que compromete a qualidade e a quantidade óssea²⁹.

A osteoporose tem alta prevalência na população mundial, acomete em sua maioria mulheres na menopausa, frente a redução da síntese de estrógeno. Esse comprometimento sistêmico está relacionado ao metabolismo ósseo, devido ao aumento da resposta de reabsorção óssea. Por esse motivo, essa condição pode ser um limitante na reabilitação oral com implantes, devido a possibilidade desses pacientes apresentarem defeitos ósseos peri-implantares, denominados 'gaps', sendo necessário a utilização de enxertos ósseos para auxiliar o travamento inicial do implante²⁹⁻³¹.

A genisteína (C₁₅H₁₀O₅) é um fitoestrógeno e isoflavona, origina-se da soja e seus derivados, cerca de 60% das isoflavonas são genisteína. A genisteína foi isolada pela primeira vez em 1899 e, pertence a família *Fabaceae Genista tinctoria* L^{32,33}. A genisteína possui diferentes atividades biológicas, atua como antioxidante e anti-inflamatório, além de ser usada na prevenção e tratamento coadjuvante de diversas patologias como, psoríase, câncer, diabetes e osteoporose³⁴⁻³⁶.

A genisteína possui semelhança estrutural comparada ao estrógeno por ser uma isoflavona, por isso, mimetiza o estrógeno natural produzido pelos ovários. Esse fitoestrógeno atua nos receptores de estrógeno (ERs α e β), através do mecanismo genômico clássico³⁷. A genisteína atua na ativação e maturação de osteoblastos

através da regulação de ER α relacionadas a expressão gênica mitocondrial que gera grande potencial na prevenção e tratamento da osteoporose³⁸.

Um estudo publicado por Luo e colaboradores em 2022, evidenciou que a genisteína possui efeito antibacteriano na resposta celular *in vitro*, enquanto possui atividade osteogênica que favorece a osseointegração observada no modelo *in vivo*. A genisteína favorece a formação óssea por melhorar a expressão de genes osteogênicos relacionados a osteoblastos enquanto inibem a diferenciação celular em osteoclastos³⁹.

Além dos efeitos da genisteína no tecido ósseo, estudos têm explorado o potencial terapêutico da genisteína na terapia de reposição hormonal e, mostraram que a dosagem de 54 mg de genisteína oral diária reduziram os sintomas da menopausa, ademais, a capacidade desse fitoestrógeno de aumentar a precipitação de matriz extracelular e melhorar a vasodilatação arterial^{28,32,33,40,41}.

A utilização sistêmica da genisteína já foi descrita na literatura em estudos *in vivo*, além de ter sido testada no reparo ósseo alveolar e no reparo peri-implantar em ratas ovariectomizadas, por nossa equipe do Laboratório para Estudos de Tecidos Mineralizados (LSMT) da FOA/UNESP. A terapia com genisteína foi testada sistemicamente em nosso laboratório, as ratas ovariectomizadas foram submetidas ao tratamento com genisteína via gavagem oral durante 120 dias, na posologia 5mg/kg/dia⁴². Os resultados positivos desse estudo relacionados à melhora quanto a atividade das proteínas da matriz extracelular e as respostas de biomineralização, levaram o nosso grupo a testar o efeito local da genisteína, incorporado à superfície de implantes osseointegráveis, gerando patente por privilégio de inovação (número do registro: BR1020210191341), financiado pela FAPESP, esse estudo concluiu que a concentração de 100 μ M de genisteína para funcionalização dos implantes manteve a viabilidade celular sem causar toxicidade em testes realizados *in vitro*, além de apresentar resultados favoráveis quanto ao reparo ósseo na interface osso/implante⁴³.

Em função do excelente desempenho local da genisteína, este estudo tem o intuito de avaliar a genisteína tópica, incrementada à biomateriais (Biogran[®], Bio-Oss[®] e Cerabone[®]) através da sonoquímica, em defeitos peri-implantares, para ser estudado seus benefícios locais.

A escolha do uso da técnica da sonoquímica, deve-se ao fato que, quando comparada à outras técnicas de mistura e homogeneização de materiais, é sustentável⁴⁴. A sonoquímica permite a redução à escala nanométrica de materiais sólidos, bem como sua homogeneização por meio de ultrassom, o que viabiliza uma variedade de materiais nanoestruturados por meio de ondas ultrassônicas em meio líquido, o que causa transformações físico-químicas através de interações entre a radiação e o biomaterial⁴⁵.

Os nanomateriais possuem importantes propriedades que contribuem para o desempenho de biomateriais na Implantodontia. Nanopartículas têm a capacidade de aumentar a reatividade do material devido suas características físico-químicas, além de possuir propriedades ópticas, elétricas, magnéticas e eletroquímicas⁴⁴.

Para a otimização do processo de sonicação, alguns parâmetros são relevantes como frequência, potência e tempo de sonicação. Desse modo, se for seguido o protocolo estabelecido, o biomaterial sonicado é obtido com as propriedades desejadas^{44,46}.

Todos os estudos sonoquímicos relatados na literatura foram realizados na frequência de 20 kHz^{44,47}. A potência de sonicação é importante para determinar o formato e tamanho das nanopartículas. Por isso, a potência de sonicação deve ser usado em níveis adequados^{47,48}. O tempo de sonicação afeta o tamanho das partículas, a sonicação de longa duração, por mais de 6 horas, resulta em nanopartículas heterogêneas⁴⁹. Sendo assim, o estudo de Gomes-Ferreira e colaboradores⁵⁰ testou diferentes tempos para sonicação do Biogran® e, foi observado que o tempo de sonicação por 15 minutos apresentou melhor desempenho devido às propriedades celulares observadas no biomaterial sonicado.

Portanto, a técnica da sonoquímica é um método viável e eficiente na incorporação de biomoléculas para funcionalização de biomateriais, o que contribui para o desenvolvimento de novos biomateriais para utilização em pacientes que apresentem comprometimento sistêmico, como a osteopenia/osteoporose.

O modelo de ratas ovariectomizadas traz um desafio a mais para os biomateriais a serem testados neste estudo, além da possibilidade de avaliar a interação da genisteína local no sítio reparacional onde a deficiência de estrógeno estará em vigência. Um estudo experimental *in vivo* em ratas ovariectomizadas

evidenciou que a osteopenia/osteoporose, devido a deficiência de estrógeno, possui influência no metabolismo ósseo peri-implantar. Portanto, o comprometimento sistêmico dificulta o travamento inicial do implante na cortical óssea superior e exacerba a reabsorção óssea que supera a formação óssea³⁰.

Vale destacar que nosso grupo tem desenvolvido diversos estudos testando diferentes biomateriais submetidos à técnica sonoquímica e o seu efeito individualizado no preenchimento de defeitos ósseos⁵⁰⁻⁵³. Por esse motivo, para o presente estudo, o nosso enfoque será no desempenho da biomolécula genisteína que será agregada aos diferentes biomateriais testados sobre o reparo peri-implantar, na presença de animais com tecido ósseo comprometido, o que constituirá um desafio a mais para as diferentes combinações de biomateriais a serem avaliadas.

Objetivo

2 OBJETIVO

Avaliar o desempenho da genisteína tópica, incorporada à biomateriais aloplásticos (Biogran®) e heterógenos (Bio-Oss® e Cerabone®) através da rota sonoquímica, no processo de reparo ósseo quando utilizados no preenchimento de defeitos peri-implantares em ratas ovariectomizadas.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Biomateriais a serem avaliados no estudo

3.1.1 Biogran® (Zimmer Biomet)

Biomaterial sintético composto por vidro bioativo com partículas de aproximadamente 300 a 355 μm .

3.1.2 Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials)

Biomaterial xenógeno de origem bovina da Austrália, composto por grânulos de 0.25 mm a 1 mm.

3.1.3 Cerabone® (Straumann)

Biomaterial xenógeno de origem bovina da Nova Zelândia, composto por fosfato de cálcio (hidroxiapatita 100% pura, fase mineral), porosidade 65 a 80%, tamanho médio dos poros 600 a 900 μm .

3.2 Redução à escala nanométrica dos Biomateriais

A mistura e homogeneização dos biomateriais foi realizada no Laboratório de Materiais Avançados e Nanotecnologia do Departamento de Física da Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP (Pesquisador Responsável: Paulo Noronha Lisboa-Filho).

As amostras foram tratadas por sonoquímica, como demonstra a **Figura 1**, utilizando os biomateriais Biogran®, Bio-Oss® e Cerabone® com 20 ml de água Milli-Q® ultrapura (Millipore, USA) em um Béquer de 50 ml, como meio para obter uma umidade homogênea e para diminuir os tamanhos das partículas. 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.

Um estudo publicado em 2019, realizado na Faculdade de Ciências de Bauru (FC/UNESP), testou diferentes tempos de sonicação para avaliar o de melhor desempenho do método na sonicação do Biogran®. Esse estudo mostrou que a

sonoquímica por 15 minutos obteve melhor desempenho. Desse modo, o Biogran[®] sonificado por 15 minutos apresentou melhores propriedades da matriz extracelular no processo de reparo ósseo em defeitos peri-implantares, apresentando melhorias na quantidade e qualidade óssea, além de melhor turnover. Assim, o tempo de sonicação por 15 minutos foi padronizado para aplicação em outras pesquisas com o Biogran[®].⁵⁰

A concentração dos biomateriais utilizados foi padronizado através de cálculos de razão em massa para que cada defeito peri-implantar fosse completamente preenchido, cada defeito peri-implantar comporta 0.025g. Cada biomaterial foi pesado em uma balança de precisão LW303iH (BEL Engineering[®], Italy) antes da técnica da sonoquímica.

As amostras foram marcadas como:

1. BG+GEN (0.22g Biogran[®]) + (0.00300g genisteína)
2. BO+GEN (0.22g Bio-Oss[®]) + (0.00300g genisteína)
3. CER+GEN (0.22g Cerabone[®]) + (0.00300g genisteína)

As amostras foram submetidas juntas ao processamento ultrassônico utilizando o Sonics[®] VCX-750 (Sonics & Materials, Inc., EUA) com 750 W de potência, amplitude de 40% e frequência de 20 kHz.⁵¹ **(Figura 2)**. Na câmara de síntese, as condições foram ar atmosférico, e o recipiente com as amostras e a ponta ultrassônica foram arrefecidos com um banho de gelo. O protocolo de tempo estipulado para as amostras BO+GEN e CER+GEN foram 3 ciclos de 3 minutos cada, totalizando 9 minutos. Para a amostra BG+GEN foi realizado 5 ciclos de 3 minutos cada, totalizando 15 minutos, devido as partículas mais resistentes do Biogran[®].⁵⁰ As amostras foram subsequentemente secas em uma estufa a 70°C (TE-394/2, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil) **(Figura 3)**, e não foi efetuado mais tratamento de recozimento térmico.⁴⁵

Figura 1 – Técnica da sonoquímica



Esquema demonstrando a técnica da sonoquímica e obtenção de nanopartículas dos biomateriais.

Fonte: Autor, 2022

Figura 2 – Protocolo utilizado na sonoquímica



A: Sonics® VCX-750 com 750 W, Ampl. 40% e 20 kHz; **B:** Béquer com o biomaterial e água Milli-Q®.

Fonte: Autor, 2023

Figura 3 – Secagem das amostras



A: Amostras dentro da estufa para evaporação da água Milli-Q®; **B:** estufa a 70°C.

Fonte: Autor, 2023

3.3 Animais (In Vivo)

3.3.1 Número amostral e delineamento experimental

O número amostral do presente estudo para cada grupo foi determinado através do Power Test disponível no website: <http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm> (OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto), baseado em resultados prévios já publicados (Gomes-Ferreira et al., 2022). As médias utilizadas para o cálculo foram 4.4 e 6.0, os desvios padrões 1.51 e 2.6, com nível de significância de 5% e poder de 95% em um teste de hipótese

unicaudal. Portanto, justifica-se o n=10 de animais utilizados em cada grupo neste estudo.

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP (Processo: 0499-2022). Para o experimento, foram necessárias 70 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), com peso de aproximadamente 300g a 400g, em idade adulta, com no máximo 6 meses, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. As ratas foram selecionadas a partir do ciclo estral constante e foram divididas aleatoriamente em sete grupos experimentais, conforme as análises a que serão submetidas.

Foram distribuídos 10 animais por grupo experimental (CLOT, BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN). Inicialmente os animais de todos os grupos, foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba, Paraná, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* até a cirurgia de ovariectomia bilateral para sessar a síntese de estrógeno pelos ovários. Sendo assim, CLOT representa o grupo controle negativo (coágulo), onde foi criado o defeito peri-implantar e instalado o implante sem a utilização de biomaterial, enquanto os grupos BGN, BON, CERN, representam os grupos controle positivo, onde foi criado o defeito peri-implantar e instalado o implante com a utilização de biomaterial comercial isolado (in natura). Desse modo, BGN (Biogran® in natura sem genisteína), BON (Bio-Oss® in natura sem genisteína), CERN (Cerabone® in natura sem genisteína). BG+GEN representa o grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado o implante associado ao biomaterial Biogran® e genisteína, BO+GEN representa o grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado o implante associado ao Bio-Oss® e genisteína, CER+GEN representa o grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado o implante associado ao Cerabone® e genisteína (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Grupos experimentais de acordo com o teste do biomaterial e número de animais

CLOT	BGN	BON	CERN
Controle -	Controle +	Controle +	Controle +
10 animais	10 animais	10 animais	10 animais

BG+GEN	BO+GEN	CER+GEN
Biogran® + genisteína	Bio-Oss® + genisteína	Cerabone® + genisteína
10 animais	10 animais	10 animais

Fonte: Autor, 2022

3.3.2 Ciclo estral

As ratas foram armazenadas no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em gaiolas individuais, por duas semanas para posteriormente ser realizado o ciclo estral por mais duas semanas, assim, foram selecionadas as ratas que ciclam normalmente para o experimento. Para isso, foi introduzido no interior da vagina uma a duas gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata, seguindo a técnica descrita por Long e Evans⁵⁴ para reconhecimento das 4 fases do ciclo estral.

3.3.3 Ovariectomia bilateral

O estudo de Teófilo *et al.*⁵⁵ confirmou a presença de osteopenia em animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. Em modelos experimentais com ratas ovariectomizadas há uma alteração do processo de reparo ósseo frente à deficiência de estrógeno.³¹

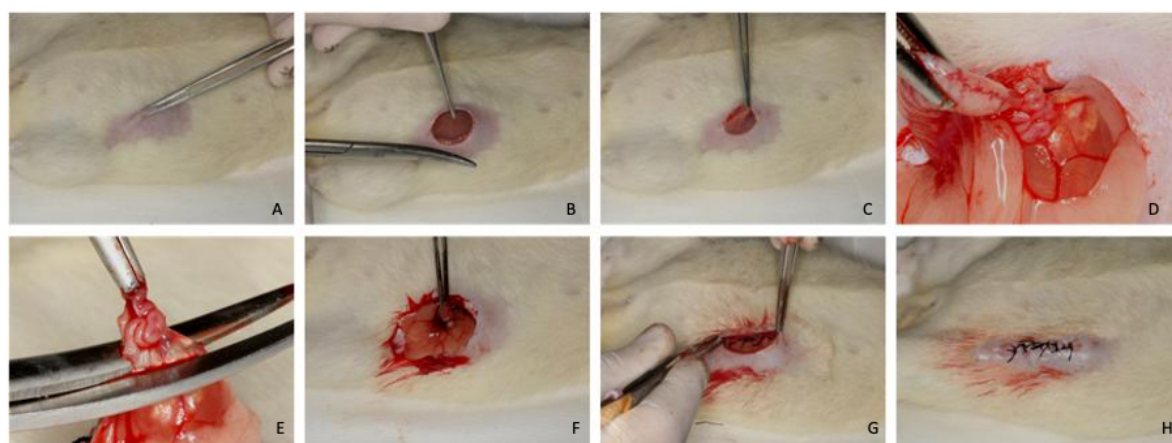
Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Ketamina (Francotar®, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum®, Bayer, São Paulo, Brasil), na dosagem de 70mg/kg e 6mg/kg,

respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório para Estudos de Tecidos Mineralizados (LSTM) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Em seguida foi realizada a tricotomia na região abdominal, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine 10 Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e aposição de campos estéreis.

Foi realizado incisão com lâmina 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita. Depois de acessar a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi afastado até identificar a trompa uterina e o ovário correspondente e, posteriormente, exteriorizá-los. A ferida cirúrgica foi suturada com fio de poliglactina 910 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) (Figura 4).

Figura 4 – Protocolo cirúrgico de ovariectomia bilateral



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.

Após 30 dias da cirurgia de ovariectomia, o ciclo estral foi avaliado novamente com a finalidade de verificar a ausência do ciclo, ou seja, a efetividade da cirurgia de ovariectomia e a indução da osteopenia. Com o sucesso da ovariectomia, 30 dias pós-cirúrgico, foi realizado a instalação dos implantes juntamente com a confecção do defeito peri-implantar.

3.3.4 Esterilização e pesagem dos biomateriais pré-cirúrgico

Os grupos BG+GEN, BO+GEN e CER+GEN foram mantidos em Béquer e esterilizados através da luz ultravioleta UV por 20 minutos antes da cirurgia de instalação de implantes. Posteriormente, foram colocados em lamínulas e realizado a pesagem em uma balança de precisão LW303iH (BEL Engineering®, Italy), assim, cada porção de 0.025g foi padronizado.

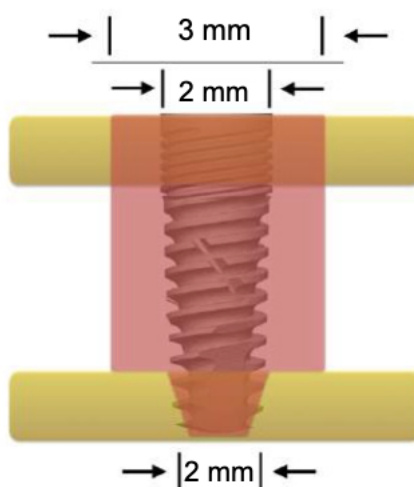
3.3.5 Cirurgia de confecção do defeito peri-implantar e instalação dos implantes

Os animais foram mantidos em jejum durante doze horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados via intramuscular pela combinação de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, 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 dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), associado à PVPI tópico. A cirurgia foi realizada de forma randomizada.

Com uma lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão 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 osso para receber os implantes.

Foram instalados 140 implantes de titânio comercialmente puro grau IV (Titaniumfix®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm (2 mm x 4 mm), esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3 mm de diâmetro nas duas corticais, e broca lança, piloto (2/3) e 3,0 mm na cortical superior e medular das tíbias, montadas em motor elétrico (BLM 600®; Driller, 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, São Paulo, Brasil), e contra ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co®, Alemanha) (**Figura 5**).

Figura 5 – Esquema demonstrando a instalação dos implantes nos grupos experimentais



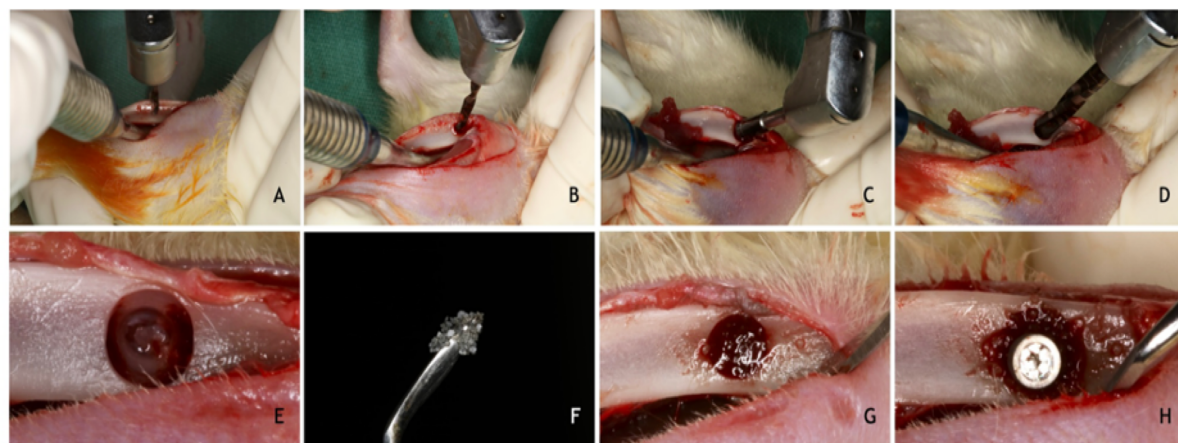
Fonte: Autor, 2022

Esse procedimento foi publicado anteriormente em estudos do nosso grupo (Gomes-Ferreira PHS et al., 2019; Gomes-Ferreira PHS et al., 2022) realizado em um grupo piloto, o qual pode ser observado na **Figura 6 e 7**.

O grupo controle negativo (CLOT) foi preenchido os defeitos peri-implantares apenas com coágulo e o implante inserido imediatamente. Os defeitos peri-implantares do grupo BGN foram preenchidos com Biogran®, os defeitos peri-

implantares do grupo BON foram preenchidos com Bio-Oss®, no grupo CERN os defeitos peri-implantares foram preenchidos com Cerabone®. Nos defeitos criados no grupo BG+GEN, o preenchimento foi feito com o Biogran® associado a genisteína e o implante inserido imediatamente. No grupo BO+GEN, o preenchimento dos defeitos foi realizado com Bio-Oss® associado a genisteína e o implante inserido imediatamente. E por fim, no grupo CER+GEN, o preenchimento dos defeitos foi realizado com Cerabone® associado a genisteína e o implante inserido imediatamente. O volume de material usado para o preenchimento dos defeitos peri-implantares, foi referente ao defeito criado pela fresa de 3 mm de diâmetro por 3,5 mm de profundidade (volume = 12,56 mm³) subtraída pelo volume do implante de 1,5 mm x 3,5 mm (volume = 6,18 mm³), totalizando 18,56 mm³ que foram utilizados de biomaterial, para que assim haja contato do enxerto com implante por toda sua extensão. Para o cálculo do volume, foi utilizado a fórmula: $V = \pi \cdot r^2 \cdot a$ (volume é igual à Pi vezes raio ao quadrado vezes altura).

Figura 6 – Protocolo cirúrgico de confecção do defeito peri-implantar e instalação dos implantes



A: Para confecção do defeito peri-implantar utiliza-se broca de 1,6 mm na cortical superior e inferior; **B:** Broca de 2 mm na cortical superior; **C:** Broca piloto 2/3 na cortical superior; **D:** Broca de 3 mm na cortical superior; **E:** Defeito criado na metáfise tibial com 3 mm na cortical superior e 1,6 mm na cortical inferior; **F:** Biomaterial sonicado; **G:** Biomaterial preenchendo o defeito; **H:** Implante instalado no centro do defeito.

Fonte: Gomes-Ferreira *et al.*⁵⁰

Figura 7 – Biomaterial preenchendo o defeito peri-implantar



Fonte: Autor, 2023

Cada animal recebeu dois implantes, sendo um em cada metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, 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. No pós-operatório imediato cada animal recebeu uma 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 em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*. A eutanásia desses animais foi realizada aos 28 dias após a instalação dos implantes, após obtenção da análise biomecânica (contra-torque).

Figura 8 – Linha do tempo experimental



Fonte: Autor, 2023

3.4 Análises realizadas

3.4.1 Análise Biomecânica (contra-torque)

Os animais foram sedados com Cloridrato de Quetamina e Xilazina e as tíbias foram acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Neodent, Curitiba, Paraná, 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 registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

3.4.2 Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Após a eutanásia dos animais, as tíbias direitas foram reduzidas e fixadas em solução de formol tamponado a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda., Catanduva, São Paulo, Brasil) por 48 horas e lavadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram deixadas em álcool 70% para que a análise microtomográfica fosse realizada através do Microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker Micro-CT, Aatselaar, Bélgica, 2003) do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. As capturas das imagens ocorreram em uma câmera com tamanho de pixel de 12.45 mm, 2672 x 4000 (fileiras por contagem). Após, as imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (SkyScan v1.6.9.8) com alisamento de 1, 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. No software Data Viewer (SkyScan 1.4.4 64 bits), as imagens foram alinhadas e um novo conjunto de dados foi salvo. As análises foram desenvolvidas no software CTAnalyzer (SkyScan CTAn, v1.12.4.0) para avaliar 100 'slices' contadas a partir da cortical inferior. Por meio desta análise, foi obtido os valores de densidade mineral e a caracterização do aspecto tridimensional do tecido ósseo formado ao redor dos implantes e no reparo peri-implantar. Os parâmetros avaliados foram: Volume Ósseo (BV), Percentual de Volume Ósseo (BV/TV), Espessura Trabecular (Tb.Th), Número de Trabéculas (Tb.N), Separação entre as Trabéculas (Tb.Sp), Superfície de

Inserção (IS). Por fim, a reconstrução 3D das imagens foram realizadas através do software CTvox (SkyScan 2.7).

3.4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do Software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose CA, EUA). Foi aplicado análise da variância (ANOVA) one way e pós teste de Tukey/Sidak para a comparação de todos os grupos entre si, incluindo o grupo controle negativo (CLOT). Também foi aplicado ANOVA two way considerando os seguintes fatores: a presença ou não da funcionalização por genisteína e cada biomaterial testado, com o objetivo de verificar a interferência da molécula bioativa incorporada aos biomateriais. O nível de confiança de 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resultados Biomecânicos (contra-torque)

Aos 28 dias é possível observar valores de torque de remoção semelhantes entre os grupos avaliados e com ausência de diferença estatística entre os grupos CLOT vs BGN, CLOT vs CER+GEN, CLOT vs BON, CLOT vs BO+GEN, BGN vs BG+GEN, BGN vs CERN, BGN vs CER + GEN, BGN vs BON, BGN vs BO+GEN, BG+GEN vs CERN, BG+GEN vs CER+GEN, BG+GEN vs BON, BG+GEN vs BO+GEN, CERN vs BO+GEN, CER+GEN vs BON.

Os resultados obtidos que apresentaram diferenças estatísticas foram entre os seguintes grupos ($p < 0,05$): CLOT vs BG+GEN ($p 0,0353$), CLOT vs CERN ($p 0,0150$), CERN vs CER+GEN ($p 0,0485$), CERN vs BON ($p 0,0331$), CER+GEN vs BO+GEN ($p 0,0150$), BON vs BO+GEN ($p 0,0100$) (**Tabela 2**).

Gráfico 1 – Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos CLOT, BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN

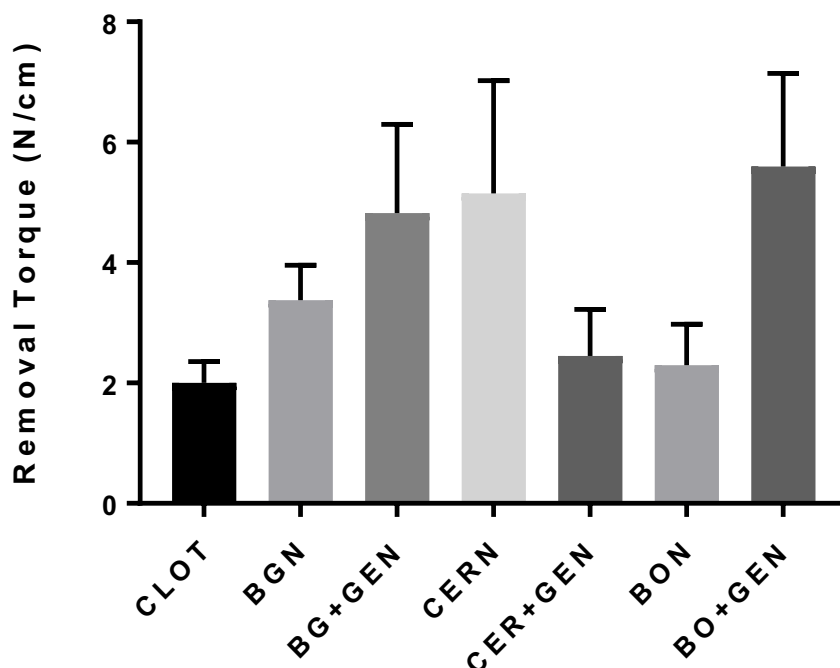


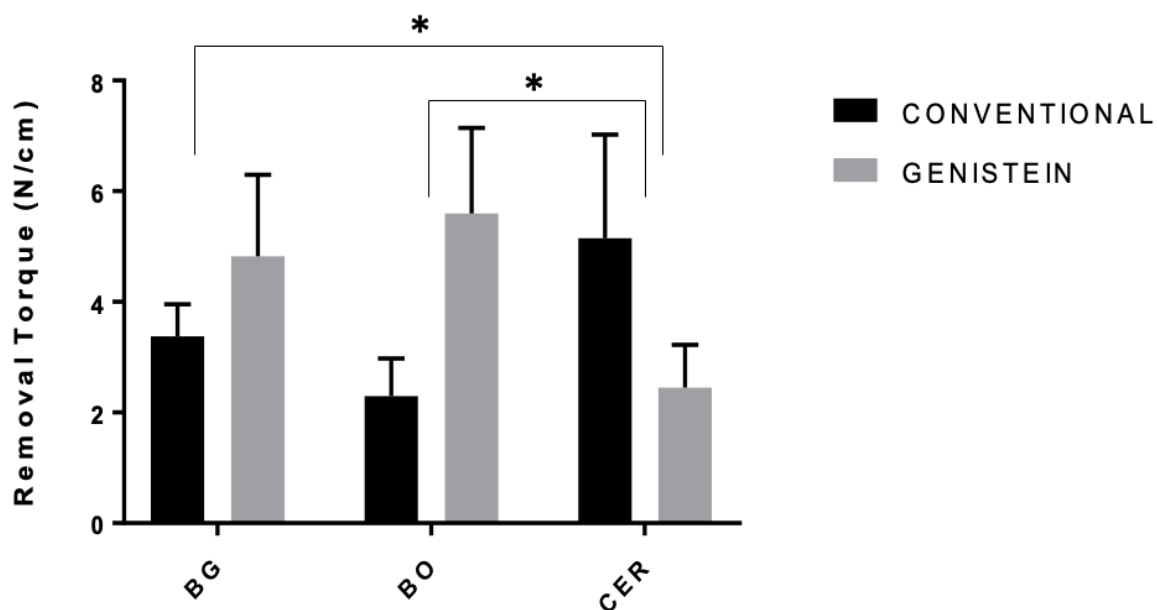
Tabela 2 – Grupos com diferença estatística ANOVA one way ($p < 0,05$). Comparação entre os grupos CLOT, BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN

Grupos	Valor de $p < 0,05$
CLOT vs BG+GEN	0,0353
CLOT vs CERN	0,0150
CERN vs CER+GEN	0,0485
CERN vs BON	0,0331
CER+GEN vs BO+GEN	0,0150
BON vs BO+GEN	0,0100

Fonte: Autor, 2023

Os resultados obtidos para verificar a interferência da funcionalização da genisteína para cada biomaterial (BG, BO e CER), com diferença estatística foram entre os seguintes grupos ($p < 0,05$): BG vs CER (p 0,0340) BO vs CER (p 0,0039) (Tabela 3).

Gráfico 2 – Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos com interferência da genisteína



Fonte: Autor, 2023

Tabela 3 – Grupos com diferença estatística ANOVA two way ($p < 0,05$). Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, CERN, CER+GEN, BON, BO+GEN

Grupos	Valor de $p < 0,05$
BG vs CER	0,0340
BO vs CER	0,0039

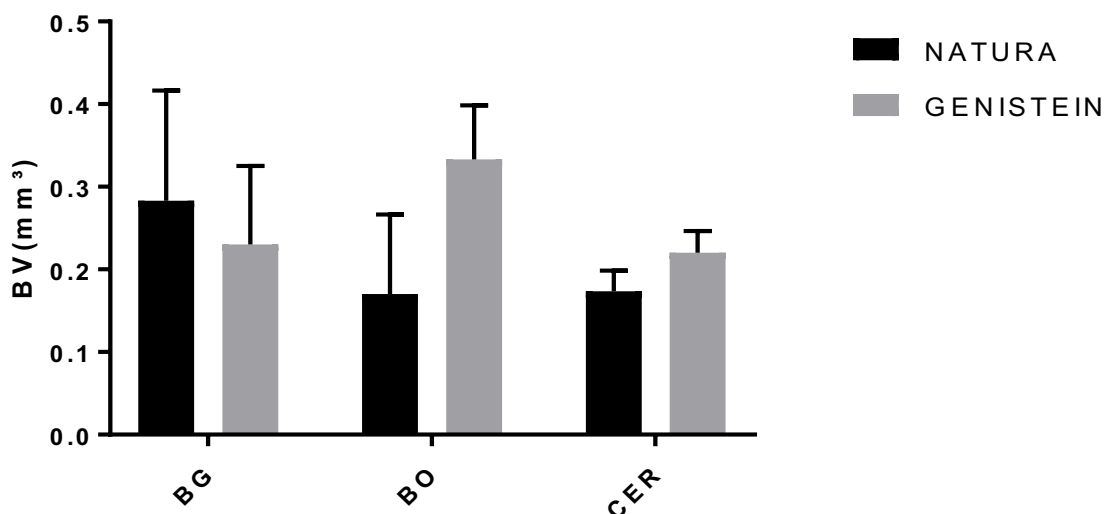
Fonte: Autor, 2023

4.2 Resultados Microtomográficos (Micro-CT)

4.2.1 Volume Ósseo (BV)

Os valores obtidos para o parâmetro volume ósseo (BV) foram os seguintes: BGN ($0,2833 \text{ mm}^3$), BG+GEN ($0,23 \text{ mm}^3$), BON ($0,17 \text{ mm}^3$), BO+GEN ($0,333 \text{ mm}^3$), CERN ($0,1733 \text{ mm}^3$), CER+GEN ($0,22 \text{ mm}^3$). Para o parâmetro volume ósseo não houve diferença estatística entre os grupos estudados (**Tabela 4**).

Gráfico 3 – Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2023

Tabela 4 – BV: Grupos sem diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER

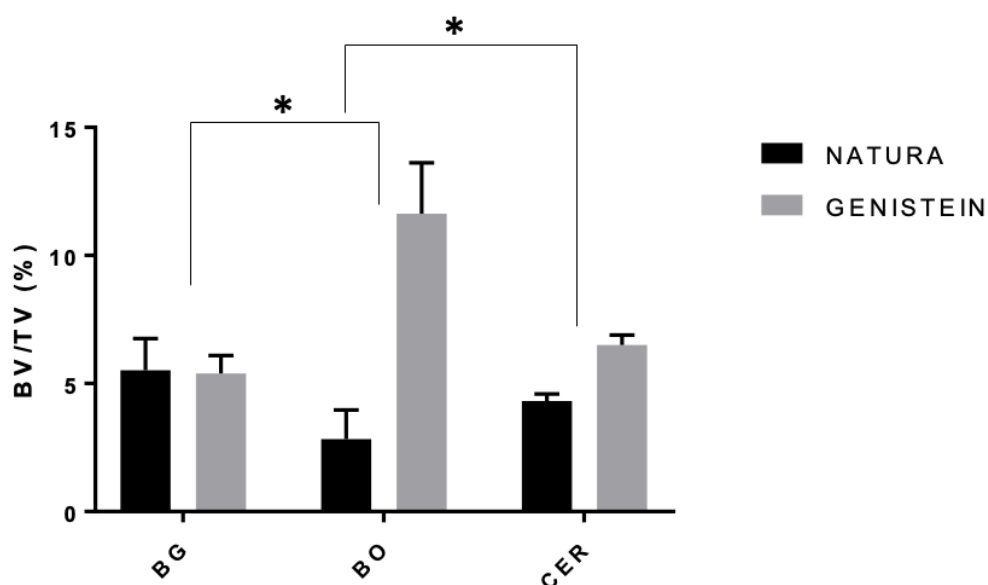
Grupos	Valor de $p > 0,05$
BG vs BO	0,2162
BG vs CER	0,2302
BO vs CER	0,9980

Fonte: Autor, 2023

4.2.2 Percentual de Volume Ósseo (BV/TV)

Os resultados obtidos para percentual de volume ósseo (BV/TV) foram os seguintes: BGN (5,52%), BG+GEN (5,403%), BON (2,767%), BO+GEN (11,63%), CERN (4,317%), CER+GEN (6,5%). Para BV/TV houve as seguintes diferenças estatísticas: BG vs BO (p 0,0188), BO vs CER (p 0,0018) (**Tabela 5**).

Gráfico 4 – Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2023

Tabela 5 – BV/TV: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER

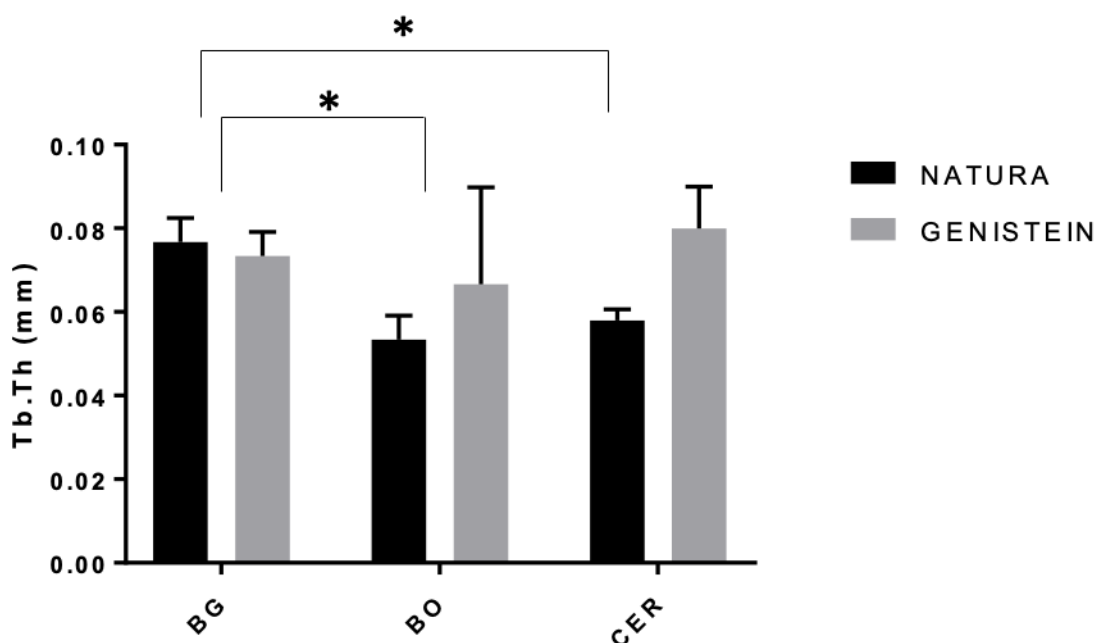
Grupos	Valor de $p < 0,05$
BG vs BO	0,0188
BO vs CER	0,0018

Fonte: Autor, 2023

4.2.3 Espessura Trabecular (Tb.Th)

Os resultados obtidos para espessura trabecular (Tb.Th) foram os seguintes: BGN (0,08233 mm), BG+GEN (0,07633 mm), BON (0,056), BO+GEN (0,06667), CERN (0,058), CER+GEN (0,08). Para Tb.Th houve as seguintes diferenças estatísticas: BG vs BO (p 0,0179), BG vs CER (p 0,0235) (**Tabela 6**).

Gráfico 5 – Quantificação da espessura trabecular. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2023

Tabela 6 – Tb.Th: Grupos com diferença estatística (p < 0,05). BG, BO, CER

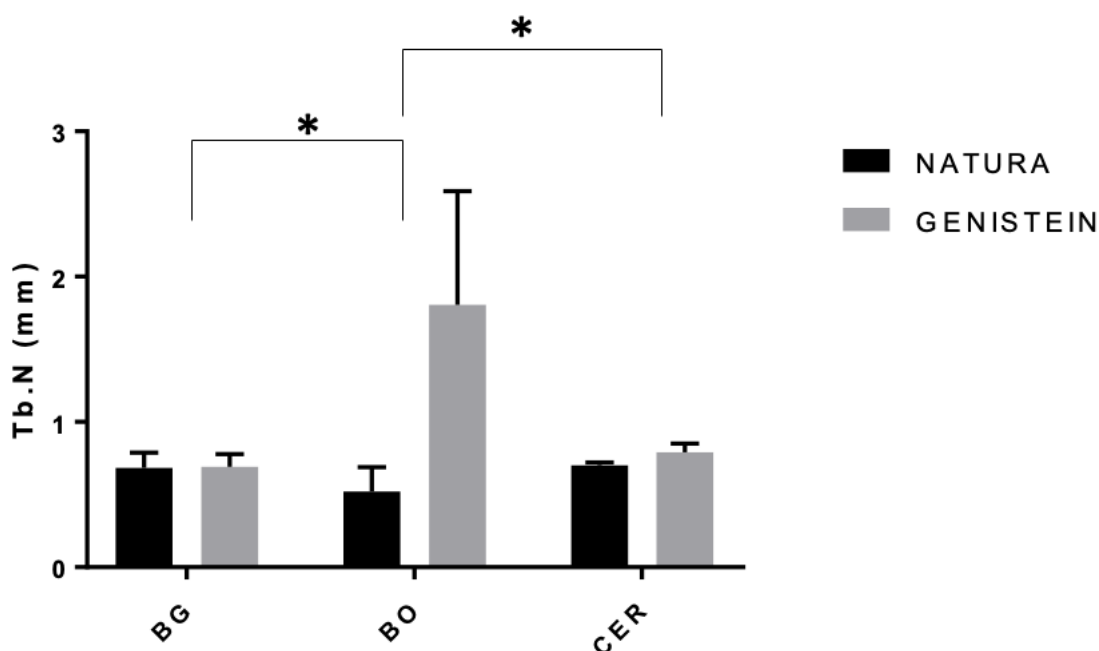
Grupos	Valor de p < 0,05
BG vs BO	0,0179
BG vs CER	0,0235

Fonte: Autor, 2023

4.2.4 Número de Trabéculas (Tb.N)

Os resultados obtidos para número de trabéculas (Tb.N) foram os seguintes: BGN (0,6833 mm), BG+GEN (0,69 mm), BON (0,52 mm), BO+GEN (1,807 mm), CERN (0,7 mm), CER+GEN (0,79 mm). Para Tb.N houve as seguintes diferenças estatísticas: BG vs BO (p 0,270), BO vs CER (p 0,0368) (**Tabela 7**).

Gráfico 6 – Quantificação de número de trabéculas. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2023

Tabela 7 – Tb.N: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER

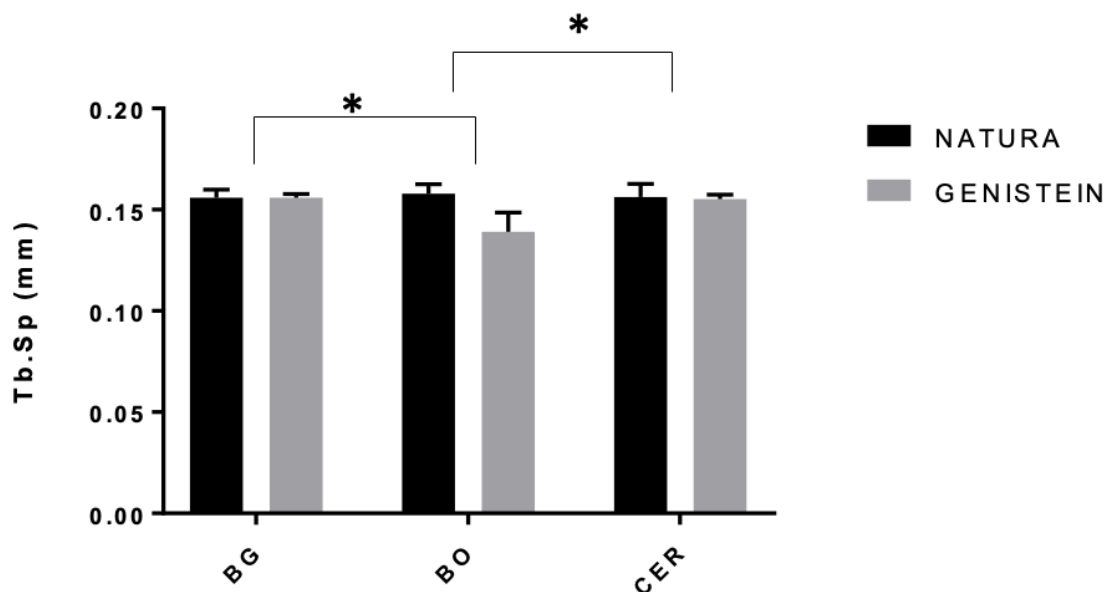
Grupos	Valor de $p < 0,05$
BG vs BO	0,270
BO vs CER	0,0368

Fonte: Autor, 2023

4.2.5 Separação entre Trabéculas (Tb.Sp)

Os resultados obtidos para separação entre trabéculas (Tb.Sp) foram os seguintes: BGN (0,156 mm), BG+GEN (0,156 mm), BON (0,158 mm), BO+GEN (0,135 mm), CERN (0,1563 mm), CER+GEN (0,1553 mm). Para Tb.Sp houve as seguintes diferenças estatísticas: BG vs BO ($p = 0,0403$), BO vs CER ($p = 0,0457$) (**Tabela 8**).

Gráfico 7 – Quantificação da separação entre trabéculas. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2023

Tabela 8 – Tb.Sp: Grupos com diferença estatística ($p < 0,05$). BG, BO, CER

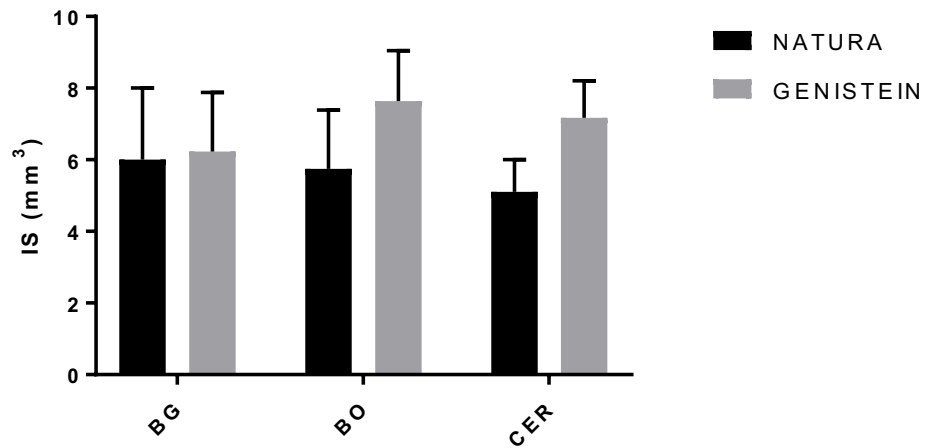
Grupos	Valor de $p < 0,05$
BG vs BO	0,0403
BO vs CER	0,0457

Fonte: Autor, 2023

4.2.6 Superfície de Inserção (IS)

Os resultados obtidos para superfície de inserção (IS) foram os seguintes: BGN (6 mm^3), BG+GEN ($6,23 \text{ mm}^3$), BON ($5,747 \text{ mm}^3$), BO+GEN ($7,633 \text{ mm}^3$), CERN ($5,1 \text{ mm}^3$), CER+GEN ($7,167 \text{ mm}^3$). Para o parâmetro superfície de inserção não houve diferença estatística entre os grupos estudados (**Tabela 9**).

Gráfico 8 – Quantificação da superfície de inserção. Comparação entre os grupos BGN, BG+GEN, BON, BO+GEN, CERN, CER+GEN



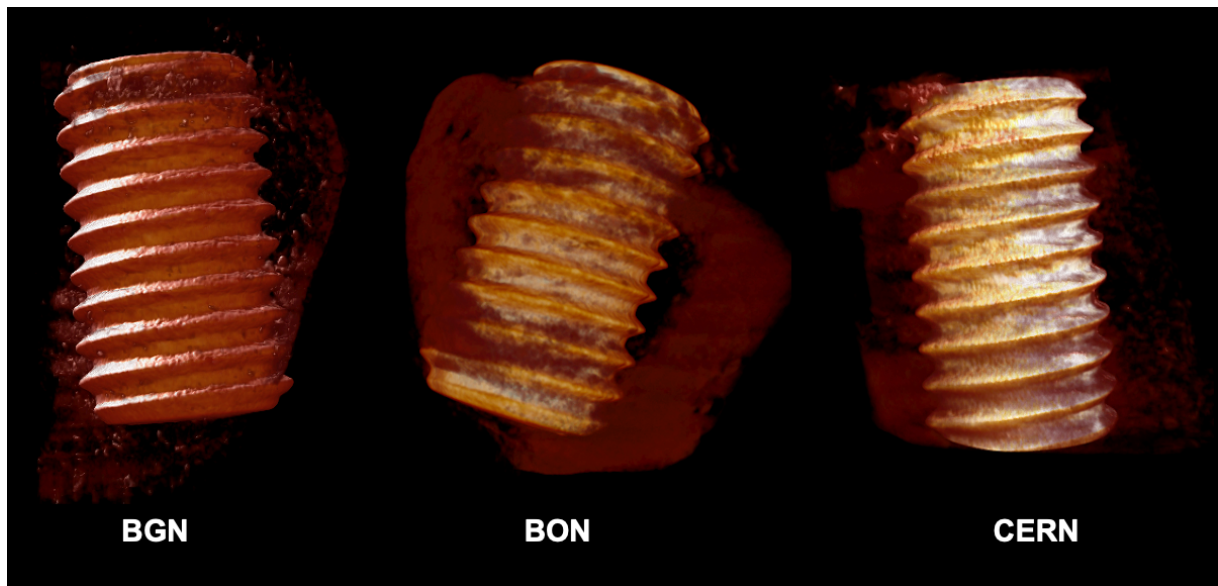
Fonte: Autor, 2023

Tabela 9 – Grupos sem diferença estatística ANOVA two way ($p < 0,05$). BG, BO, CER

Grupos	Valor de $p > 0,05$
BG vs BO	0,2162
BG vs CER	0,2302
BO vs CER	0,9980

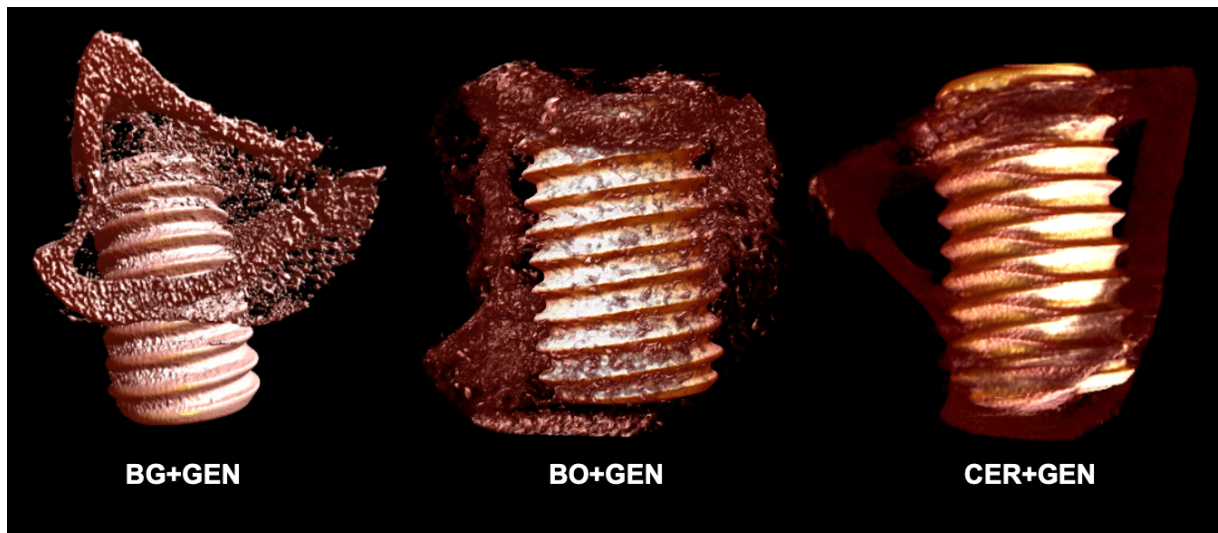
Fonte: Autor, 2023

Figura 9 – Reconstrução 3D dos grupos in natura. BGN, BON, CERN



Fonte: Autor, 2024

Figura 10 – Reconstrução 3D dos grupos funcionalizados com genisteína. BG+GEN, BO+GEN, CER+GEN



Fonte: Autor, 2024

Discussão

5 DISCUSSÃO

Através da análise biomecânica de torque de remoção realizada no experimento *in vivo* foi possível observar que houve uma melhora no processo de reparo ósseo nos grupos BG+GEN e BO+GEN, no qual foi utilizado a biomolécula genisteína para funcionalização dos biomateriais através da rota sonoquímica, quando comparado aos grupos *in natura*. Isso mostra que, partículas em escala nanométrica (nm) aumentam a reatividade do biomaterial. Em contrapartida, o grupo CER+GEN não mostrou uma otimização do reparo ósseo quando comparado ao Cerabone® *in natura*. Além disso a genisteína mostrou uma excelente performance quando associada ao Biogran® e Bio-Oss®, no qual resultou em uma melhor qualidade óssea ao redor dos implantes instalados em tíbias de animais com comprometimento sistêmico causado pela ovariectomia.

Com a análise microtomográfica é possível avaliar a microarquitetura do tecido ósseo peri-implantar. As respostas da microarquitetura óssea provenientes desta análise demonstraram que a funcionalização com genisteína do Biogran® e, em especial, do Bio-Oss® proporcionou melhorias morfométricas significativas. Além disso, pacientes com distúrbios metabólicos relacionados ao tecido ósseo, como a osteoporose, se beneficiam ainda mais com o uso de substitutos ósseos heterógeno, devido as suas propriedades não absorvíveis.⁷²

Em procedimentos cirúrgicos de instalação de implantes osseointegráveis em mandíbulas de pacientes com osteopenia ou osteoporose, ou seja, apresentam perda de massa e densidade óssea, no qual pode resultar em diminuição da estabilidade primária, aumentando a taxa de falha dos implantes⁵⁷⁻⁶². Para melhorar a estabilidade primária, suporte e previsibilidade cirúrgica, biomoléculas como a genisteína combinadas com substitutos ósseos podem aumentar a quantidade e qualidade do tecido ósseo e devem ser mais exploradas em estudos clínicos.

Na literatura, a osteoporose ainda é considerada um “hot topic” quando se trata de reabilitação com implantes osseointegráveis. Um estudo pré-clínico examinou a proporção de tecido ósseo em contato com implantes colocados na tíbia de ratos Wistar com osteoporose induzida. Foi observado que a diminuição da massa óssea nos ratos osteoporóticos levou a uma redução da área de contato entre o implante e o tecido ósseo, o que pode resultar em menor estabilidade^{61,62}.

Enquanto em estudos clínicos controlados e randomizados mostraram valores mais elevados de perda óssea marginal foram observados em pacientes com osteoporose do que em pacientes saudáveis. Esses dados são importantes porque a perda óssea marginal é considerada a principal causa de falhas secundárias em implantes osseointegráveis⁶³⁻⁶⁷.

Por esse motivo, este estudo visa obter um substituto ósseo com melhores propriedades biológicas que permitam sua utilização em cirurgias de implantes que auxilie no seu travamento inicial, na presença de defeitos ósseos peri-implantares, em virtude do prejuízo gerado através de comprometimentos sistêmicos que afetam o tecido ósseo. A funcionalização de substitutos ósseos com moléculas bioativas que proporcionem uma ação local no sítio peri-implantar tem sido uma alternativa inovadora. A busca por alternativas fitoterapêuticas é frequente devido aos seus efeitos colaterais mínimos quando comparados à fármacos sintéticos.

Os biomateriais Biogran[®], Bio-Oss[®] e Cerabone[®] possuem importante potencial osteocondutor, a escolha da biomolécula de genisteína para ser associada a este biomaterial deve-se ao fato de desempenhar duplo papel que influencia na formação óssea e no processo inflamatório.

A genisteína estimula a diferenciação de células pré-osteoblásticas chamadas MC3T3-E1 em osteoblastos maduros, sendo importante para o turnover ósseo⁶⁸. Um estudo *in vitro* mostrou que a genisteína pode induzir a expressão do gene ER α através da ativação da proteína MAPK/NF-kB/protein-1 presente na matriz extracelular e, conseqüentemente, estimula expressões gênicas relacionadas à diferenciação e mineralização de osteoblastos⁶⁹.

O processo de cicatrização pós-operatória envolve células inflamatórias associadas ao sistema imunológico inato. As isoflavonas são eficazes na modulação da inflamação aguda pós-operatória, responsáveis por ativar a via de óxido nítrico, que atua na vasodilatação e auxilia na nutrição celular, otimizando o processo de reparo ósseo^{70,71}.

Portanto, a genisteína associada ao Biogran[®], Bio-Oss[®] e Cerabone[®] é uma alternativa que deve ser considerada e mais estudada, para pacientes com osteopenia e osteoporose que necessitem de reabilitação oral com implantes. Por isso, os resultados deste trabalho devem ser considerados para a realização de novos estudos

com foco clínico para avaliar a viabilidade da genisteína com diferentes tipos de substitutos ósseos durante a terapia com implantes dentários.

Desta forma, com os resultados obtidos quanto à avaliação biomecânica e microtomográfica, considera-se que numa próxima etapa, estudos caracterizando as respostas celulares e moleculares, serão relevantes para a completa caracterização da resposta peri-implantar nas condições experimentais avaliadas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a genisteína associada ao Biogran® e ao Bio-Oss® em ratas com deficiência de estrógeno otimizou o processo de reparo ósseo peri-implantar. Entretanto, a genisteína incorporada ao Cerabone® não obteve benefícios. No entanto, mais análises desses grupos devem ser feitas para verificar mais benefícios da genisteína para osseointegração.

Referências

REFERÊNCIAS

1. BRANEMÅRK, P. I. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Supplementum**, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.
2. BRANEMÅRK, P. I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Supplementum**, v. 16, p. 1-132, 1977.
3. MARTINS, V. *et al.* Osseointegração: análise de fatores clínicos de sucesso e insucesso. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 32, n. 1, p. 26-31, 2011.
4. FAVERANI, L. P. *et al.* Osseointegrated implants: evolution and success. **Salusvita**, v. 30, n. 1, p. 47-58, 2011.
5. ALBREKTSSON, T.; ALBREKTSSON B. Osseointegration of bone implants: A review of an alternative mode of fixation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 58, p. 567-577, 1987.
6. SCOMBATTI, S. L.; MORAES JÚNIOR, E. F.; CARVALHO, E. B. S. Reconstrução óssea do rebordo alveolar para aumento do suporte labial. **INPerio**, v. 4, n. 6, p. 1058-1060, 2019.
7. OKAMOTO, T. *et al.* Homogenous implant in rat tibias of matrix preserved in 98% glycerin: histomorphologic study. **Brazil Dentistry Journal**, v. 11, n. 2, p. 79-87, 2000.
8. PERRI, P. S.; PELLIZZER, E. P. **Fundamentos em implantodontia: uma visão contemporânea**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Napoleão Quintessence, 2015.
9. FARDIN, A. C. *et al.* Bone graft in dentistry: review of literature. **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.
10. VEIS, A. A. *et al.* Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles. **Implant Dentistry**, v. 15, n. 4, p. 386-394, 2006.

11. MENEZES, J. D. *et al.* Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, p. 20170296, 2018.
12. 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.
13. MICHELETTI, C. *et al.* From Tissue retrieval to electron tomography: nanoscale characterization of the interface between bone and bioactive glass. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 18, n. 182, p. 20210181, 2021.
14. BERGLUNDTH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 8, n. 2, p. 117-124, 1997.
15. VAN HOUTT, C. I. A. *et al.* The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 106, n. 1, p. 131-142, 2018.
16. KEIL, C. *et al.* Histological evaluation of extraction sites grafted with Bio-Oss Collagen: Randomized controlled trial. **Annals of Anatomy**, v. 237, p. 151722, 2021.
17. ZHUANG, G. *et al.* Influence of different incision designs on bone increment of guided bone regeneration (Bio-Gide collagen membrane + Bio-Oss bone powder) during the same period of maxillary anterior tooth implantation. **Bioengineering**, v. 12, n.1, p. 2155-2163, 2021.
18. ZHANG, J. Y. *et al.* Safety and efficacy of midface augmentation using Bio-Oss bone powder and Bio-Gide collagen membrane in Asians. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 3, p. 959, 2023.
19. RADETIC, A. T. J. *et al.* CSBD-healing in rats after application of bovine xenogeneic biomaterial enriched with magnesium alloy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 9089, 2021.

20. DALAPRIA, V. *et al.* LED photobiomodulation therapy combined with biomaterial as a scaffold promotes better bone quality in the dental alveolus in an experimental extraction model. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 3, p. 1583-1592, 2022.
21. KLASSMANN, F. A. *et al.* A randomized trial of the bone formation after maxillary sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite (Cerabone®) and photobiomodulation: histomorphometric and immunohistochemical analysis. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 15, n. 7, p. 542-550, 2023.
22. PELOZA, O. C. *et al.* Dynamics of CSBD-healing after implementation of dentin and xenogeneic bone biomaterial. **Materials**, v. 16, n. 4, p. 1600, 2023.
23. NAGAHARA, K. *et al.* Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 7, n. 1, p. 72-79, 1992.
24. LONG, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 27-31, 2011.
25. CHEN, F. *et al.* Isolation and culture of human primary osteoblasts: Comparing the effects of differences in method details on osteoblast characteristics. **Genes & Diseases**, v. 11, n. 2, p. 546-549, 2024.
26. ERIKSEN, E. F. *et al.* Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 84-86, 1988.
27. COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 419-447, 2001.
28. YANG, T. S. *et al.* Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal woman. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 51, n. 2, p. 229-235, 2012.
29. AMADEI, S.U. *et al.* Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2017.
30. WAGNER, F. *et al.* Does osteoporosis influence the marginal peri-implant bone level in female patients? A cross-sectional study in a matched collective.

- Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 19, n. 4, p. 616-623, 2017.
31. INOUE, S. *et al.* Effect of ovariectomy induced osteoporosis on metaphysis and diaphysis repair process. **Injury**, v. 52, p. 1300-1309, 2021.
 32. YU, L. *et al.* Genistein: Dual role in women's health. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3048, 2021.
 33. GARBIER, E. *et al.* Genistein – Opportunities related to an interesting molecule of natural origin. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 815, 2022.
 34. POTTER, S.M. *et al.* Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1375S-1379S, 1998.
 35. MEI, J.; YEUNG, S. S.; KUNG, A. W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal woman. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5217-5221, 2001.
 36. RASHEED, S. *et al.* Therapeutic potentials of genistein: new insights and perspectives. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. e14228, 2022.
 37. KUIPER, G. G. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.
 38. WU, G. J. *et al.* genistein triggers translocation of estrogen receptor-alpha in mitochondria to induce expressions of ATP synthesis-associated genes and improves energy production and osteoblast maturation. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 49, n. 4, p. 901-923, 2021.
 39. LUO, S. *et al.* Genistein loaded into microporous surface of nano tantalum/PEEK composite with antibacterial effect regulating cellular response in vitro and promoting osseointegration in vivo. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 125, p. 104972, 2022.
 40. MORABITO, N. *et al.* Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind

- placebo-controlled study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 10, p. 1904-1912, 2009.
41. THANGAVEL, P. *et al.* Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3892, 2019.
42. BATISTA, F. R. S. **Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrógeno tratadas com fitoestrógeno genisteína. Análise histométrica, imunoistoquímica, microtomográfica, biomecânica, e por microscopia confocal a laser.** 2018. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.
43. HASSUMI, J. S. **Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica.** 2021. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.
44. KUMAR, R.; KUMAR, V. B.; GEDANKEN, A. Sonochemical synthesis of carbon dots, mechanism, effect of parameters, and catalytic, energy, biomedical and tissue engineering applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 105009, 2020.
45. ARRUDA, L. B. *et al.* Morphological modifications and surface amorphization in ZnO sonochemically treated nanoparticles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 799-804, 2013.
46. MOHANDES, F.; NIASARI-SALAVATI, M. Sonochemical synthesis of silver vanadium oxide micro/nanorods: solvent and surfactant effects. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 354-365, 2013.
47. BROTHIE, A.; GRIESER, F.; ASHOKKUMAR, M. Effect of power and frequency on bubble size distributions in acoustic cavitation. **Physical Review Letters**, v. 102, n. 8, p. 084302, 2009.

48. KANDJANI, A. E.; TABRIZ, M. F.; POURABBAS, B. Sonochemical synthesis of ZnO nanoparticles: the effect of temperature and sonication power. **Materials Research Bulletin**, v. 43, p. 645-654, 2008.
49. MOREL, M. H. *et al.* Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. **Cereal Chemistry Journal**, v. 77, p. 685-691, 2000.
50. GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* Sonochemical time standardization for bioactive materials used in peri-implant defects filling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 56, p. 437-446, 2019.
51. LISBOA-FILHO, P. N. *et al.* Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. **Connective Tissue Research**, v. 58, n. S1, p. 97-100, 2018.
52. GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* PTH 1-34-functionalized bioactive glass improves peri-implant bone repair in orchietomized rats: Microscale and ultrastructural evaluation. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112688, 2022.
53. SIQUEIRA, N. B. *et al.* 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**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2022.
54. LONG J. A.; EVANS, H. M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. **Memoirs of the University of California**, v. 6, p. 1-148, 1922.
55. TEÓFILO, J. M. *et al.* Comparação entre dois protocolos experimentais para promover osteoporose no osso maxilar e na tíbia proximal de ratas. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 302-306, 2003.
56. MONTEIRO, N. G. **Avaliação das respostas de biomineralização pelo *Rubus coreanus* frente à deficiência de estrogênio.** Um estudo translacional. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

57. VON WOWER, N.; KOLLERUP, G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 67, n. 5, p. 656-660, 1992.
58. SHAPURIAN, T. *et al.* Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 21, n. 2, p. 290-297, 2006.
59. DRAGE, N. A. *et al.* A comparison of bone mineral density in the spine, hip, and jaws of edentulous subjects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, p. 496-500, 2007.
60. LIRANI-GALVÃO, A. P. R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, p. 171-178, 2010.
61. GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 31, n. 9, p. 1807-1815, 2020.
62. GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* Evaluation of Vitamin D isolated or associated with Teriparatide in peri-implant bone repair in tibia of ovariectomized rats. **Biology**, v. 12, n. 2, p. 228, 2023.
63. YAMAZAKI, M. *et al.* Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 87, n. 4, p. 411-418, 1999.
64. XIAO, J.R. *et al.* The biomechanical analysis of simulating implants in function under osteoporotic jawbone by comparing cylindrical, apical tapered, neck tapered, and expandable type implants: a 3-dimensional finite element analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 7, p. e273-e278, 2011.
65. CHRCANOVIC, B. R.; ALBREKTSSON, T.; WENNERGERG, A. Reasons for failures of oral implants. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 41, n. 6, p. 443-476, 2014.
66. LEMOS, C. A. A. *et al.* Do dental implants placed in patients with osteoporosis have higher risks of failure and marginal bone loss compared to those in healthy

- patients? A systematic review with meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 27, p. 2483-2493, 2023.
67. LEMOS, C. A. A. *et al.* Effect of bone quality and bone loss level around internal and external connection implants: A finite element analysis study. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 125, n. 1, p. 137.e1-137.e10, 2021.
68. NISHIDE, Y. *et al.* Combined effects of soy isoflavones and β - Carotene on osteoblast differentiation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 13750-13761, 2015.
69. LIAO, M.H. *et al.* Genistein induces oestrogen receptor- α gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/ NF- κ B/activator protein-1 and promotes cell mineralization. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 1, p. 55-63, 2014.
70. WANG, X. *et al.* Genistein absorbed mesoporous bioactive glass with enhanced osteogenesis properties. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 321-328, 2020.
71. SARKAR, N.; BOSE, S. Controlled release of soy isoflavones from multifunctional 3D printed bone tissue engineering scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 114, p. 407-442, 2020.
72. ZHANG, Q. *et al.* Histomorphometric study of new bone formation comparing defect healing with tree bone grafting materials: the effect of osteoporosis on graft consolidation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 33, n. 3, p. 645-652, 2018.

ANEXOS

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais



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 utilização de substitutos ósseos funcionalizados por genisteína no preenchimento de defeitos periimplantares: estudo pré-clínico em ratas ovariectomizadas**", Processo FOA nº 0499-2022, 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 29 de Julho de 2022.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 30 de Julho de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Agosto de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of bone repair after use of genistein functionalized bone substitutes to fill peri-implant defects: preclinical study in ovariectomized rats**", Protocol FOA nº 0499-2022, 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 29, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 30, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 30, 2024.

Prof. Dr. 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

ANEXO B – Certificado de Apresentação



CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby certify that
Nathália Dantas Duarte

presented the following abstract as an **ePoster** in the topic field of
Basic Research

ABSTRACT N° PO-BR-104 (EAO DGI 2023-271) entitled
"Effect of local Genistein incremented to Biogran® in peri-implant bone defects in tibia of ovariectomized rats: Preliminary Results"

Nathália Dantas Duarte: Faculty of Dentistry, UNESP, Araçatuba, Brazil | Paulo Noronha Lisboa-Filho: Faculty of Science, UNESP, Bauru, Brazil | Pedro Henrique Silva Gomes-Ferreira: Faculty of Dentistry, UNESP, Araçatuba, Brazil | Roberta Okamoto: Faculty of Dentistry, UNESP, Araçatuba, Brazil

during the EAO- DGI Joint Meeting 2023 (28-30 September, 2023) in Berlin, Germany

This abstract has been included in the Clinical Oral Implants Research (COIR) supplement.

Vincent Laudun
 EAO Congress Project Manager

EAO OFFICE
 38 rue Croix des Petits Champs
 75001 PARIS - FRANCE
 SAS au capital de 50 000 €
 RCS Paris 815 522 125 - TVA FR 84 81 45 24 146

European Association for Osseointegration
 c/o EAO Office 38 rue Croix des Petits Champs 75001 Paris
eaocongress@eao.org – +33 (0)1 42 36 62 17

ANEXO C - Os dados apresentados na dissertação serão submetidos na Acta Materialia

ISSN: 1359-6454

Qualis: A1

Fator de Impacto: 9.4

