UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

ANA CLÁUDIA ERVOLINO DA SILVA

Avaliação do reparo ósseo após a instalação de implantes funcionalizados com medicação anabólica associada à administração sistêmica de antireabsortivo em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica

Araçatuba

2021

ANA CLÁUDIA ERVOLINO DA SILVA

Avaliação do reparo ósseo após a instalação de implantes funcionalizados com medicação anabólica associada à administração sistêmica de antireabsortivo em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Implantodontia.
Orientadora: Prof[a] Assoc. Roberta Okamoto
Coorientadora: Prof[a] Assoc. Luana Marotta Reis Vasconcellos

Araçatuba

2021

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Silva, Ana Cláudia Ervolino da.
S586a Avaliação do reparo ósseo após a instalação de implantes funcionalizados com medicação anabólica associada à administração sistêmica de antireabsortivo em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica / Ana Cláudia Ervolino da Silva. – Araçatuba, 2021
57 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientadora: Profa. Luana Marotta Reis Vasconcellos

1. Osteoporose 2. Teriparatida 3. Ácido risedrônico 4. Implantes dentários I. T.

Black D7
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Dedicatória

À minha mãe Edna e meu pai José Maria

Mãe, você é minha melhor amiga e maior fonte de inspiração. Com seu amor e dedicação, sempre me ajudou e me incentivou a perseguir os meus sonhos. Sempre acreditou no meu potencial, por muitas vezes mais do que eu mesma acreditava. Dedico a você tudo o que sou hoje e o que conquistei. Muito obrigado por sempre me apoiar e ser um porto seguro na minha vida. Saiba que amo você e me orgulho em ser tua filha.

Ao meu pai que sempre se esforçou para me dar o melhor. Sei que muitas vezes você e minha mãe deixaram suas necessidades de lado para dar prioridade às minhas e dos meus irmãos. Não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão por tudo o que fez e faz na minha vida. Espero um dia poder retribuir toda a sua dedicação e apoio. Sem vocês eu jamais chegaria até aqui.

Aos meus irmãos Paula e Rafael

Pela cumplicidade, apoio e companheirismo por toda a minha trajetória, pela proteção e cuidado que tiveram comigo. Eu sempre estarei aqui para o que precisarem. Obrigado por tornar mais fácil e feliz minha passagem por esta vida. Amo vocês.

Agradecimentos especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

Agradeço por ter permitido que tudo isso acontecesse e por ter iluminado meu caminho durante esta jornada. Pela força, sabedoria e discernimento dados a mim, principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço também por ter colocado no meu caminho tantas pessoas que me ajudaram nessa caminhada.

À querida professora, orientadora e amiga, Professora Assoc. Roberta Okamoto

Sou profundamente grata pela oportunidade de poder realizar o mestrado com a sua orientação, que me norteou em todas as situações de dificuldade encontradas pelo caminho, sempre me dando apoio, com muita dedicação e paciência. A sua competência, e a forma como a senhora trabalha é um modelo de inspiração para mim. Sempre vou aprender com a senhora, me tornando a cada dia uma pessoa melhor.

Ao Professor Ass. Dr. Francisley Ávila Souza.

Tenho imensa admiração pelo senhor e pelo seu trabalho. Agradeço pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos compartilhados. Agradeço pela amizade e fácil convívio com o senhor, o qual faz as coisas serem muito mais agradáveis.

À Professora Dra. Thallita Pereira Queiroz.

Agradeço o aceite ao convite de participação como banca avaliadora deste trabalho. Sou uma admiradora do seu trabalho e agradeço por poder contar com as suas contribuições na avaliação deste estudo.

À Professora Assoc. Luana Marotta Reis Vasconcellos.

Agradeço pela coorientação e contribuição valiosa neste estudo. Sua disponibilidade e auxílio foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de poder acompanhar um pouco do seu admirável trabalho.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Agradeço por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados durante o meu mestrado. Vocês têm a minha admiração.

Ao meu namorado Cássio

Pelo companheirismo e cumplicidade em tudo o que faço, pelo amor e amizade e por estar ao meu lado em todos os momentos. O seu apoio e incentivo foram essenciais

durante essa etapa. Muito obrigada por compartilhar sua vida e seus sonhos comigo. Te amo e te admiro muito.

À minha cunhada e amiga Letícia Pitol Palin

Que sempre esteve ao meu lado desde a graduação e iniciação científica. Agradeço por tornar a experiência do mestrado mais fácil e divertida com a sua amizade e apoio. Obrigada pelo auxílio que sempre pude contar nos momentos de dificuldade, e saiba que você pode contar com a minha amizade sempre.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Agradeço por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados durante o meu mestrado. Vocês têm a minha admiração.

Aos amigos do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Pelos momentos de aprendizado durante todo o meu mestrado, e pela amizade que construímos. Agradeço pela disponibilidade, auxílio e boa vontade de cada um de vocês, que tornaram todo o trabalho mais agradável.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem**

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" na pessoa do Prof. Assoc. André Luís Fraga Briso.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela prontidão em nos atender e carinho.

Ao Departamento de Ciências Básicas, pelo acolhimento e por viabilizar a execução de todas as etapas deste estudo.

Aos colegas do programa de pós graduação em Odontologia, das áreas de Implantodontia; Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial; Prótese; Periodontia; Ortodontia; Clínica Integrada; Dentística; Estomatologia e Odotnopediatria. Meu muito obrigada.

À Medens, pelo fornecimento dos discos de titânio e implantes osseointegráveis utilizados neste estudo.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À FAPESP, processo nº 2019/09946-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Um dia , quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste.”

Sigmund Freud

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a ação da associação de medicação sistêmica (bifosfonato oral) e teriparatida como medicação local funcionalizando as superfícies dos implantes. Para a realização deste projeto, o mesmo foi divido em 2 etapas. A primeira etapa consistiu na determinação do melhor protocolo para a funcionalização de implantes com teriparatida, a partir da técnica layer by layer. Ainda nesta etapa, foram realizados testes físicos e in vitro (culturas de células) a fim de avaliar as propriedades da superfície funcionalizada, quanto à melhora nas respostas osteogênicas. A segunda etapa consistiu na realização de experimentos in vivo para avaliar o efeito desta superfície funcionalizada durante o reparo periimplantar. Para isso, 96 ratas Wistar, adultas jovens foram divididas em seis grandes grupos: 1. Grupo SHAM (n=16), no qual os animais foram submetidos à ovariectomia fictícia e dieta balanceada. 2. Grupo SHAM/SM (n=16), no qual os animais receberam dieta de cafeteria. 3. Grupo OVX (n=16), no qual os animais foram submetidos a cirurgia de ovariectomia e não receberam tratamento medicamentoso. 4. Grupo OVX/SM (n=16), no qual os animais foram submetidos à cirurgia ovariectomia e receberam dieta de cafeteria. 5. Grupo OVX/RIS (n=16), no qual os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e tratados com risedronato de sódio. 6. Grupo OVX/SM/RIS (n=16), no qual os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e à dieta de cafeteria associada ao tratamento medicamentoso com risedronato de sódio. Em cada grande grupo há dois subgrupos: A- implantes convencionais e B- implantes funcionalizados com teriparatida. No dia 0 foi realizada a ovariectomia ou cirurgia fictícia. Passados 30 dias foi iniciado o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio. Após 30 dias do início do tratamento medicamentoso, os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar superior direito, em seguida receberam os implantes na região onde foi realizada a exodontia. Aos 28 dias após a instalação dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia para mensuração do torque de remoção. Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade (Shapiro Wilk). Houve a confirmação de distribuição normal dos dados amostrais e na sequência, foi realizado o teste paramétrico ANOVA One Way, seguido do pós teste de Tukey, com o nível de significância de 5% ($p<0,05$). Os implantes funcionalizados apresentaram os maiores valores de torque de remoção em todos os grupos experimentais. A associação sistêmica entre o risedronato de sódio e teriparatida de forma tópica fez com que o grupo

OVX/SM/RIS teriparatida obtivesse o maior torque de remoção quando comparado aos demais grupos. Com isso, conclui-se que o desempenho clínico dos implantes funcionalizados com teriparatida foi favorável, no entanto, quando associado à administração sistêmica de risedronato de sódio, os resultados se tornam mais promissores.
Palavras-chave: Osteoporose. Teriparatida. Ácido risedrônico. Implantes dentários.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the action of the association of systemic medication (oral biphosphonate) and teriparatide as local medication functionalized to the surfaces of implants. For the execution of this project, it was divided in 2 stages. The first stage consisted in determining the best protocol for the functionalization of implants with teriparatide, based on the layer by layer technique. Still in this stage, physical and in vitro tests (cell cultures) were performed in order to evaluate the properties of the functionalized surface, regarding the improvement in osteogenic responses. The second stage consisted in conducting in vivo experiments to evaluate the effect of this surface functionalized during the peri-implant repair. For this, 96 Wistar rats, young adults were divided into six large groups: 1. SHAM Group (n=16), where the animals underwent sham surgery and balanced diet. 2. SHAM/SM Group (n=16), in which the animals received a cafeteria diet. 3) Group OVX (n=16), in which the animals underwent ovariectomy without drug treatment. 4. Group OVX/SM (n=16), in which the animals underwent ovariectomy and received a cafeteria diet. 5. Group OVX/SM/RIS (n=16), in which the animals underwent ovariectomy surgery and cafeteria diet associated with drug treatment with sodium risedronate. 6. Group OVX/RIS (n=16), in which the animals underwent ovariectomy and were treated with sodium risedronate. In each large group there are two subgroups: A- conventional implants and B- implants functionalized with teriparatide. After 30 days of beginning the drug treatment, the animals were submitted to bilateral first molar exodontia, then received the implants in the region where the exodontia was performed. At 28 days after installation of the implants, the animals were euthanized to measure the removal torque. The data were submitted to the homoscedasticity test (Shapiro Wilk). There was confirmation of normal distribution of the sample data and in the sequence, the parametric test ANOVA One Way was performed, followed by Tukey's post-test, with the significance level of 5% ($p<0.05$). The functionalized implants had the highest removal torque values in all experimental groups. The systemic association between sodium risedronate and teriparatide topically resulted in the OVX/SM/RIS teriparatide group obtaining the highest removal torque when compared to the other groups. Thus, it is concluded that the clinical performance of implants functionalized with teriparatida was favorable, however, when associated with systemic administration of sodium risedronate, the results become more promising.

Keywords: Osteoporosis. Teriparatide. Risedronic acid. Dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tempos experimentais do grupo SHAM referentes à avaliação periimplantar. 29

Figura 2 - Tempos experimentais do grupo SHAM/SM referentes à avaliação periimplantar. 30

Figura 3 - Tempos experimentais do grupo OVX referentes à avaliação periimplantar. 30

Figura 4 - Tempos experimentais do grupo OVX/SM referentes à avaliação periimplantar. 30

Figura 5 - Tempos experimentais do grupo OVX/RIS referentes à avaliação periimplantar. 31

Figura 6 - Tempos experimentais do grupo OVX/SM/RIS referentes à avaliação periimplantar. 31

Figura 7 - Técnica cirúrgica para remoção bilateral dos ovários. 34

Figura 8 - Técnica cirúrgica para exodontia do primeiro molar superior direito dos animais experimentais. 35

Figura 9 - Imagem representativa das dimensões do implante instalado nas maxilas dos animais (1.4mmX2.7mm) 36

Figura 10 - Técnica para instalação de implante na região do primeiro molar superior dos animais experimentais. 37

Figura 11 - Gráfico referente à média dos resultados de viabilidade celular ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey) 39

Figura 12 - Gráfico referente à média dos resultados de formação de nódulos de mineralização frente à presença de teriparatida ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey) 40

Figura 13 - Gráfico referente à média dos resultados de genotoxicidade frente à presença de teriparatida ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey) 41

Figura 14 - Gráfico referente à média das medidas de peso (g) de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey) 42

Figura 15 - Gráfico referente à média das medidas de glicemia (mg/dl) de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey). 43

Figura 16 - Gráfico referente à média do Índice de Lee de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey). 44

Figura 17 - Avaliação biomecânica do torque de remoção dos grupos experimentais: SHAM, SHAM/SM, OVX, OVX/SM, OVX/RIS e OVX/SM/RIS. Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p<0,05$, ANOVA e pós teste de Tukey) 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais referente à avaliação periimplantar 29

Tabela 2 - Quantidade diária de dieta de cafeteria 33

LISTA DE SIGLAS

BMU - Unidade básica multicelular

E2 - Estradiol

FDA - Food and drug administration

HDL - Lipoproteína de alta densidade

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

MSCF – Fator estimulador de colônias de macrófagos

OPG - Osteoprotegerina

PTH – Paratormônio

RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL - Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B

SERMS – Modulador seletivo de receptor de estrógeno

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1 MATERIAL E MÉTODOS 25

2.1 FASE 1 – FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES E SUA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA E BIOLÓGICA 25
2.1.1 Tratamento medicamentoso na superfície dos implantes *25*
2.2 Experimentos de cultura de células, para validação biológica das superfícies a serem estudadas *26*
2.2.1 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular *26*
2.2.2 Determinação da viabilidade celular *27*
2.2.3 Análise da formação de nódulos de mineralização *27*
2.2.4 Teste de micronúcleos *27*
2.2 FASE 2 – EXPERIMENTOS IN VIVO COM O MODELO EXPERIMENTAL PROPOSTO. 28
2.2.1 Delineamento experimental *28*
2.2.2 Animais *32*
2.2.3 Ciclo Estral *32*
2.2.4 Síndrome metabólica – dieta de cafeteria *33*
2.2.5 Ovariectomia *33*
2.2.6 Técnica para extração dental *34*
2.2.7 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis na maxila *35*
2.2.8 Tratamento medicamentoso sistêmico com risedronato de sódio *37*
2.2.9 Análise biomecânica – torque de remoção *37*
2.2.10 Análise Estatística *38*

3 RESULTADOS 39

3.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR 39
3.2 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO 39
3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS 40
3.4 DADOS CLÍNICOS 41
3.4.1 Peso *41*
3.4.2 Glicemia *42*
3.4.3 Índice de Lee *43*
3.5 ANÁLISE BIOMECÂNICA – TORQUE DE REMOÇÃO 44

4 DISCUSSÃO 46

5 CONCLUSÃO 50

REFERÊNCIAS 51

ANEXOS 57

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA 57

1 INTRODUÇÃO

A prevalência do uso de implantes osseointegráveis em pacientes com mais de 55 anos vem aumentando substancialmente desde 1999, e tem projeção de aumento em 23% para 2026.[1] O aumento da popularidade dos implantes osseointegráveis para substituir dentes perdidos está relacionado ao sucesso que esse tipo de reabilitação oferece. O desempenho clínico favorável dos implantes é atribuído ao fenômeno da osseointegração, conceituada por Branemark em 1965 como uma união direta, estrutural e funcional entre o implante e o tecido ósseo, sem que haja interposição de tecido fibroso na interface osso/implante.[2] Após a instalação do implante, forma-se uma rede de fibrina que atua como um suporte para a migração de células osteogênicas responsáveis por formar o tecido osteóide. Por sua vez, o tecido osteóide é progressivamente substituído por osso lamelar por meio da remodelação óssea, e este mantém contato direto com o implante, constituindo a osseointegração.[3-5] O desequilíbrio entre os fatores locais anabólicos e catabólicos que atuam na formação e remodelação óssea podem comprometer a osseointegração, resultando em falha das reabilitações.

A osteoporose pós menopáusica, caracterizada por um desequilíbrio do ciclo de remodelação, em que a reabsorção se sobrepõe sobre a formação óssea, acomete grande parte da população que procura por reabilitação com implantes osseointegráveis, tornando o prognóstico dessas pacientes pouco favorável. Estima-se que aproximadamente 99 milhões de pessoas com mais de 50 anos foram diagnosticadas com osteoporose nos Estados Unidos em 2010.[6] Uma série de fármacos são propostos para o tratamento da osteoporose pós menopáusica, objetivando a prevenção das fraturas esqueléticas dos indivíduos portadores dessa desordem osteometabólica. Os bifosfonatos são fármacos amplamente prescritos com o intuito de aumentar a densidade mineral óssea (DMO) e diminuir o risco de fraturas esqueléticas em pacientes portadores de osteoporose, promovendo bons resultados nesse aspecto. Porém, pouca atenção é dada ao impacto que o mecanismo de ação desse fármaco gera no processo de reparo ósseo. Os bisfosfonatos, que têm alta afinidade pela hidroxiapatita, são absorvidos pelos osteoclastos na superfície óssea quando estes reabsorvem o osso. Assim, os bifosfonatos induzem a apoptose de osteoclastos pela via do mevalonato.[7] Como resultado, a renovação óssea é suprimida devido a diminuição das taxas de remodelação óssea.

Ao ocorrer uma injúria ao tecido ósseo, os osteócitos, células capazes de captar alterações na matriz óssea, coordenam uma sinalização para que os osteoclastos iniciem a reabsorção da matriz danificada. Após a reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose e precursores de osteoblastos são recrutados para que se inicie a formação óssea pelos osteoblastos da área reabsorvida. Dessa forma, a remodelação óssea ocorre de forma estreitamente coordenada para restauração e manutenção de um tecido ósseo saudável.[8]

A condição da menopausa aumenta significativamente a ocorrência de síndrome metabólica (SM), caracterizada por um conjunto de três ou mais desordens metabólicas como resistência à insulina, obesidade abdominal, dislipidemia e hipertensão, que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.[9] A deficiência de estrógeno, encontrada após a menopausa, promove acúmulo de gordura abdominal e inflamação do tecido adiposo, diminui a elasticidade vascular e aumenta o colesterol de lipoproteína de baixa densidade.[10] Estudos sugerem que a SM em mulheres na menopausa pode promover a redução da DMO.[11-13] A redução do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) reduz a atividade osteogênica nas células vasculares, e o tecido adiposo abdominal aumenta as citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Essas citocinas podem modular indiretamente a expressão do receptor do ligante NF-kappa B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) que pode resultar em perda óssea.[14,15] Estudos mostram uma relação entre osteoporose e síndrome metabólica[16-18] estando ambas as condições presentes em grande parte da população. Entretanto, mais estudos se fazem necessários, para que esta correlação seja mais bem caracterizada.[19]

Ao ser submetido à ação do bifosfonato, o tecido ósseo tem sua capacidade de remodelação suprimida prejudicando o processo de osseointegração. Ainda, os bifosfonatos parecem ter uma ação antiangiogênica que contribui negativamente com a osseointegração, uma vez que a vascularização é de importância crítica para esse processo, já que a diferenciação das células osteogênicas depende estritamente da vascularização do tecido. Essa alteração no metabolismo ósseo pode contribuir para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares (ONJ), como tem sido relatado na literatura.[20-25]

Considerando o número de pacientes que fazem uso de bifosfonato e estão suscetíveis a desenvolver complicações pós operatórias à instalação de implantes, torna-se necessário a utilização de métodos para promover melhores respostas de formação óssea ao redor dos implantes. A modificação das superfícies dos implantes à base de

titânio tem sido utilizadas como forma de estimular as vias de formação óssea. A utilização de moléculas bioativas, como fármacos que auxiliam no processo de formação óssea, parecem ter um efeito promissor para a osseointegração quando aderidas à superfície do implante.[26] Uma substância que poderia ser utilizada, em função do seu efeito anabólico sobre o tecido ósseo, e consequentemente estimulando a atividade osteoblástica seria a teriparatida. A teriparatida, um medicamento à base de PTH, 1-34, é um agente anabólico que foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos para o tratamento de osteoporoses graves por ser um agente anabolizante do tecido ósseo que aumenta a densidade mineral óssea.[27] A teriparatida estimula a formação e remodelação óssea, aumentando assim a DMO e melhorando a microarquitetura óssea. O tratamento com teriparatida é o único método comprovado e aprovado para aumentar a massa óssea e melhorar a arquitetura óssea. Várias vias celulares no osteoblasto são ativadas pelo PTH, e a ativação dessas vias resulta no recrutamento osteoblástico para a unidade de remodelação.[28] Alguns casos clínicos bem sucedidos de uso off-label de teriparatida para o tratamento de osteonecrose causada por bifosfonatos foram relatados, os quais mostraram que o PTH, 1-34 foi efetivo no tratamento da osteoporose e pode ser uma valiosa terapêutica no tratamento da osteonecrose de mandíbula ou maxila associada aos bifosfonatos.[29-33]

Além da utilização do PTH 1-34 sistêmico, sua ação tópica vem sendo estudada, a qual mostrou resultados promissores com injeções locais em alvéolos pós exodonticos de ratos, promovendo melhora nas características da cicatrização do osso alveolar[34]. A incrementação do PTH, 1-34 foi testada também diretamente no titânio, mostrando resultados em que foi liberado PTH local suficiente para influenciar com eficácia a expressão do gene osteoblástico/osteocítico, o que sugere a potencial eficácia da liberação localizada do PTH[35]

Tendo em vista que a utilização sistêmica de um bifosfonato como tratamento para osteoporose já foi descrita na literatura por nossa equipe (Ramalho-Ferreira, 2015)[36], no qual ratos tratados com alendronato de sódio apresentaram tecido ósseo de baixa qualidade e atraso no processo de reparo Peri-implantar, este estudo tem o intuito de avaliar a associação de um bifosfonato sistêmico ao efeito local de PTH, 1-34 funcionalizado na superfície de implantes.

Sendo assim, o presente estudo tem como proposta avaliar o comportamento reparacional do osso Peri-implantar de ratas submetidas à ovariectomia e portadoras de síndrome metabólica frente à ação sistêmica do risedronato (bifosfonato oral) associado

à teriparatida administrada localmente, incorporado à superfície dos implantes a serem instalados.

1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fase 1 – Funcionalização da superfície dos implantes e sua caracterização físico – química e biológica

Foi realizada a funcionalização das superfícies dos implantes com o fármaco teriparatida e na sequência, foram executados os testes biológicos, com o objetivo de caracterizar as superfícies desenvolvidas quanto à sua composição e perfil de liberação, para que sejam validadas para a utilização nos experimentos in vivo.

2.1.1 Tratamento medicamentoso na superfície dos implantes

A superfície dos implantes foi funcionalizada pela preparação de filmes Layer-bylayer (LbL). Tal técnica consiste na imersão de um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície) por um determinado intervalo de tempo numa solução aquosa contendo o material a ser depositado. A carga deste material deve ser contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática. Posteriormente, o conjunto substrato + monocamada é lavado a fim de eliminar o excesso de material. Em seguida o conjunto pode ser seco com ar comprimido, nitrogênio ou ventilador e então imerso numa solução contendo outro material, agora de carga contrária à do material inicialmente depositado, formando assim os filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas. O novo conjunto substrato + bicamada é lavado e pode ser seco novamente. Foi empregado o eletrólito poliestireno sulfonado (PSS) (carga negativa), no qual o fármaco estava disperso, e uma solução eletrolítica de TiO2 (carga positiva) previamente preparada pelo método sol-gel[37]. A solução de PSS será preparada contendo o fármaco teriparatida (PTH, 1-34). A melhor concentração do fármaco foi determinada a partir de testes de dose/resposta pela técnica de Espectroscopia da região do ultravioletra-visível (UV-Vis).

O crescimento de filmes pela técnica LbL é de domínio no Laboratório de Materiais Avançados da UNESP de Bauru, coordenado pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho. Vale destacar que o grupo de pesquisa do Professor Paulo possui ampla experiência quanto à funcionalização de superfícies de implantes, o que será fundamental para o desenvolvimento desta etapa do processo.[38]

2.2 Experimentos de cultura de células, para validação biológica das superfícies a serem estudadas.

A superfície funcionalizada pelo fármaco foi avaliada biologicamente, a partir de experimentos em culturas de células que foram desenvolvidos no laboratório da Professora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT)– UNESP São José dos Campos – SP.

2.2.1 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, os experimentos de cultura de células foram executados. Os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta das amostras doadoras. Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α-MEM – Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque). No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura osteogênico de acordo com Rosa et al., 2008.[39] Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Nunc, Dinamarca) e incubadas a 37ºC com 5% de CO2 (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente[40]. Foram plaqueadas 2x104 células viáveis em cada poço da microplaca de 24 poços (Nunc, Dinamarca), sendo acrescentado meio de cultura osteogênico para obtenção do volume final de 1 mL. Estas placas foram incubadas a 37ºC com 5% de CO2 e os osteoblastos de todos os grupos foram avaliados quanto a viabilidade celular, a formação de nódulos de mineralização e genotoxicidade do fármaco. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicada, sendo cada triplicata um pool de células provenientes do fêmur de 4 animais de cada grupo. O grupo controle utilizado em todos os testes foi a superfície com duplo ataque ácido da empresa Emfils®

2.2.2 Determinação da viabilidade celular

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazo] (Sigma Aldrich) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Como controle positivo foi utilizado solução de fenol a 0,2% e o controle negativo, o fundo da placa. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após os períodos de 03, 07 e 14 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU), de acordo com Andrade et al., 2015.[41] Os dados foram aferidos como absorbância.

2.2.3 Análise da formação de nódulos de mineralização

As células, foram incubadas a 37ºC/5% de CO2 por 14 dias e após este período foi quantificada a formação de nódulos de mineralização, utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma Chemical Chemical, USA), que foi mensurada no espectofotômetro a 405nm, de acordo com Andrade et al., 2015[41]. Os valores foram obtidos em absorbância.

2.2.4 Teste de micronúcleos

Para avaliar o dano nuclear presente nas células mesenquimais, foi realizada avialiação nos períodos de 5 e 10 dias utilizando o teste de micronúcleos. As células mesenquimais obtidas dos fêmures foram cultivadas meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α-MEM – Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) a 37°C e 5% CO2. Para o teste, 3x105 células foram cultivadas em lâminas de vidro em 4 mL de meio celular por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO2. Em seguida, as células foram incubadas com citocalasina B (Sigma-Aldrich) na concentração de 6 μg/mL por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO2 para inibir a citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. As células foram submetidas ao choque hipotônico e fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 10 min (procedimento repetido 3 vezes). Após secagem, as células foram coradas em GiemsaWright a 5% por 6 minutos. Os micronúcleos foram analisados em microscópio de imersão (100X), sendo avaliadas 2.000 células/placa por concentração em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos são identificados como estruturas de

DNA contidas no citoplasma, claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Foram contadas as células com menos de cinco micronúcleos.

2.2 Fase 2 – Experimentos in vivo com o modelo experimental proposto.

Após caracterização das superfícies desenvolvidas, foram iniciados os experimentos in vivo a serem executados no modelo experimental proposto para este estudo, com o objetivo de avaliar a ação sinérgica entre fármacos administrados local e sistemicamente. Vale destacar que será utilizado o modelo de instalação de implantes na maxila das ratas, com o intuito de avaliar o efeito do bisfosfonato oral sobre os ossos maxilares e qual a possível melhora deste quadro frente ao tratamento de superfície com teriparatida (PTH, 1-34).

2.2.1 Delineamento experimental

Para mimetizar a deficiência de estrógeno e a síndrome metabólica, as ratas (Rattus novergicus albinus, Wistar) foram submetidas à cirurgia de ovariectomia e alimentadas com dieta de cafeteria e será administrado sistemicamente o risedronato como medicação anti-osteoporose. O fármaco administrado localmente será a teriparatida, que será incorporado à superfície dos implantes a ser instalado na maxila das ratas. A incorporação do fármaco à superfície dos implantes ocorrerá na primeira fase deste projeto. A análise proposta para este estudo é a análise biomecânica, obtida pela mensuração do torque de remoção dos implantes após 28 dias da instalação dos mesmos (tabela 1).

No tempo zero, as ratas selecionadas para o experimento serão submetidas a cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia bilateral. Após a recuperação da cirurgia, os animais receberão a dieta de cafeteria para a determinação da Síndrome Metabólica. Passados 30 dias (t=30), o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio (0,7mg/kg/semana) ou solução salina, via gavagem, será iniciado. Aos 30 dias após o início do tratamento medicamentoso (t = 60d) serão feitas as cirurgias de exodontia do primeiro molar superior direito seguida da instalação dos implantes osseointegráveis na maxila desses animais.

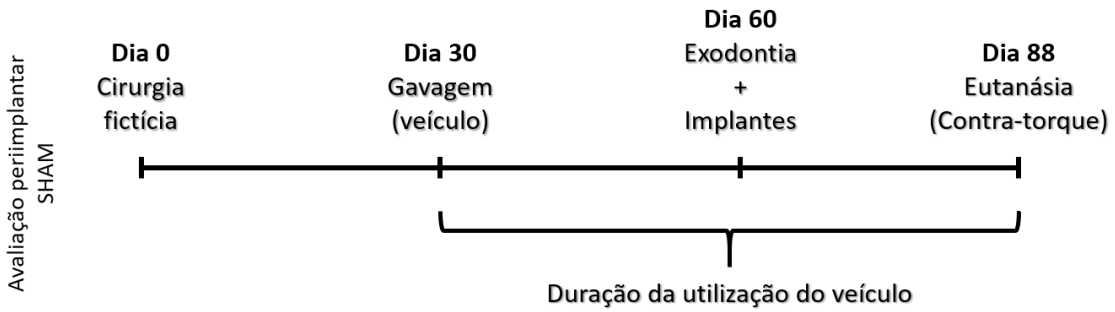
Aos 28 dias após a instalação dos implantes (dia da eutanásia, t= 88), os animais serão anestesiados e nas maxilas do lado direito, os implantes serão removidos utilizando um torquímetro digital, para obtenção dos dados de torque de remoção (Figura 1-6)

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais referente à avaliação periimplantar.

Grupo experimental	Tipo de implante	Análise de biomecânica
SHAM	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8
SHAM/SM	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8
OVX	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8
OVX/SM	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8
OVX/RIS	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8
OVX/SM/RIS	Implante teriparatida	8
	Implante convencional	8

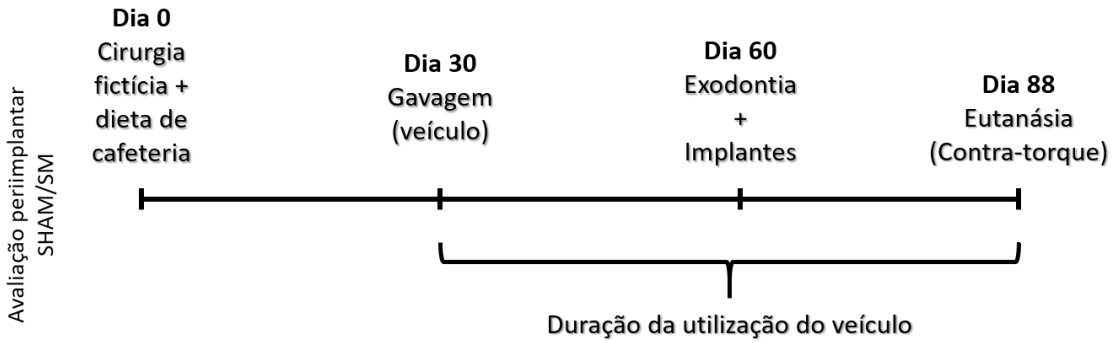
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 1 - Tempos experimentais do grupo SHAM referentes à avaliação periimplantar.



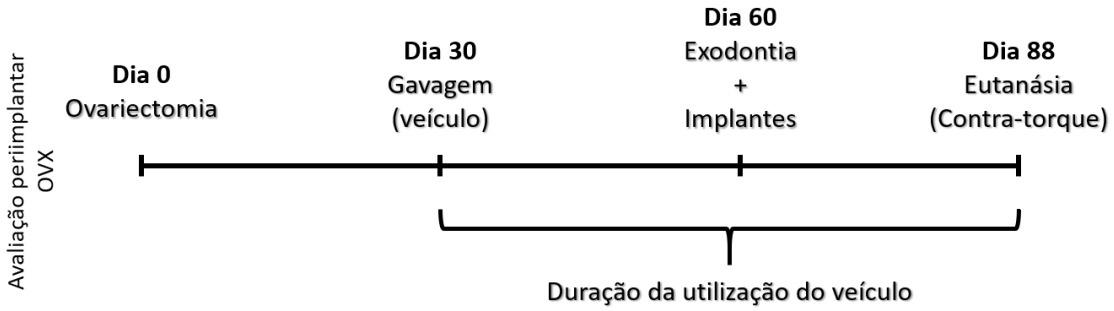
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 2 - Tempos experimentais do grupo SHAM/SM referentes à avaliação periimplantar.



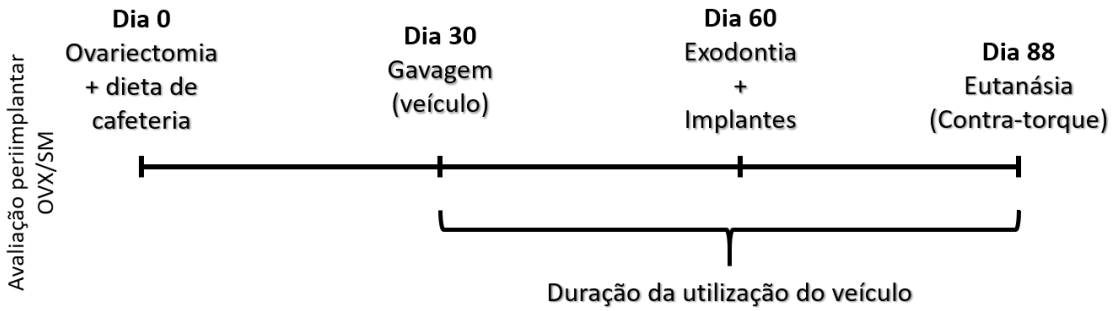
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 3 - Tempos experimentais do grupo OVX referentes à avaliação periimplantar.



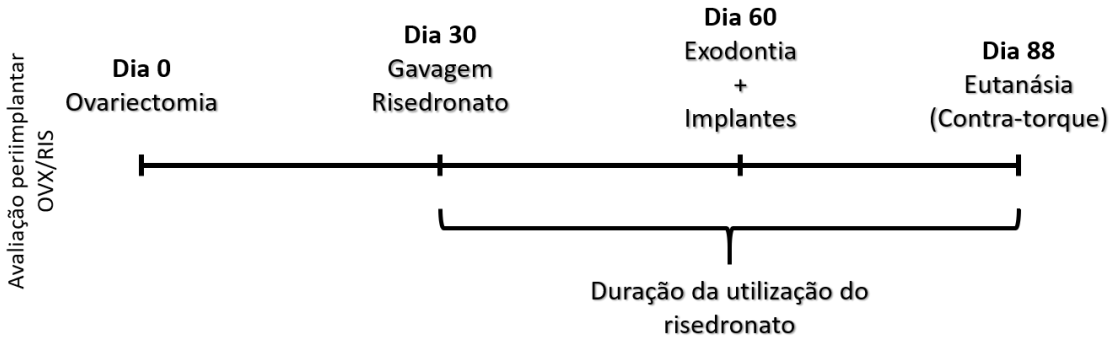
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 4 - Tempos experimentais do grupo OVX/SM referentes à avaliação periimplantar.



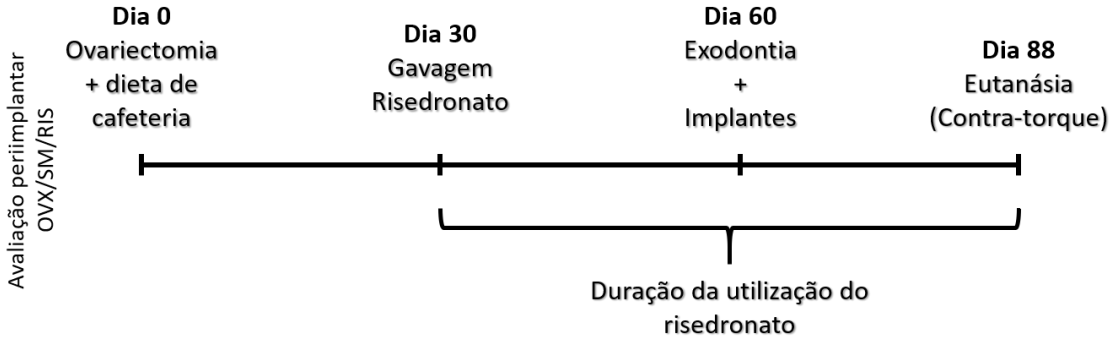
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 5 - Tempos experimentais do grupo OVX/RIS referentes à avaliação periimplantar.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 6 - Tempos experimentais do grupo OVX/SM/RIS referentes à avaliação periimplantar.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

2.2.2 Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição (protocolo 00434-2019), foi dado início aos experimentos propostos. No presente estudo foram utilizadas 96 ratas Wistar (Rattus novergicus albinus) provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Ao início do experimento as ratas tinham idade de 4 meses e peso corporal compreendido ao redor de 250 gramas. Os animais foram mantidos em biotério climatizado e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas e receberam água ad libitum. Em função do modelo de síndrome metabólica, após uma semana no biotério para adaptação às condições ambientais, recebendo ração de composição nutricional balanceada e água ad libitum, as ratas passaram a receber dieta de cafeteria, como será descrito na sequência, sendo mantida a água ad libitum. As 96 ratas foram divididas em seis grandes grupos: 1. Grupo SHAM (n=16), no qual os animais foram submetidos à ovariectomia fictícia e dieta balanceada. 2. Grupo SHAM/SM (n=16), no qual os animais receberam dieta de cafeteria. 3. Grupo OVX (n=16), no qual os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia sem tratamento medicamentoso. 4. Grupo OVX/SM (n=16), no qual os animais foram submetidos à ovariectomia e à dieta de cafeteria. 5. Grupo OVX/SM/RIS (n=16), no qual os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e dieta de cafeteria associado ao tratamento medicamentoso com risedronato de sódio. 6. Grupo OVX/RIS (n=16), no qual os animais foram submetidos à ovariectomia e ao tratamento com risedronato de sódio.

Em cada grande grupo haverá dois subgrupos: A- implantes convencionais e B- implantes funcionalizados com teriparatida.

2.2.3 Ciclo Estral

Para garantir que as ratas selecionadas para os experimentos estavam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata (técnica de Long & Evans, 1922[43] 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 cirugia de ovariectomia bilateral realizada.

2.2.4 Síndrome metabólica – dieta de cafeteria

Para os animais dos grupos SHAM/SM, OVX/SM e OVX/SM/Ris foi oferecida uma dieta de alta densidade energética (hiperlipídica) de cafeteria, durante todo o experimento, seguindo os modelos de Gomez-Smith et al. 2016 e Carillon et al. 2013[44,45]. Para cada animal foi pesado diariamente uma quantidade de 30g da alimentação, que variou entre bolachas recheadas, bolachas tipo "waffer", salgadinho de milho. Além disso, 50 ml de solução de sacarose a 12% foi disponibilizada diariamente para cada animal (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantidade diária de dieta de cafeteria

Alimentos	Quantidade (g/rato/dia)
Bolacha Recheada	10
Bolacha Tipo "Waffer"	10
Salgadinho de Milho	10
Água + Açúcar (12%)	24g em 200ml de água

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

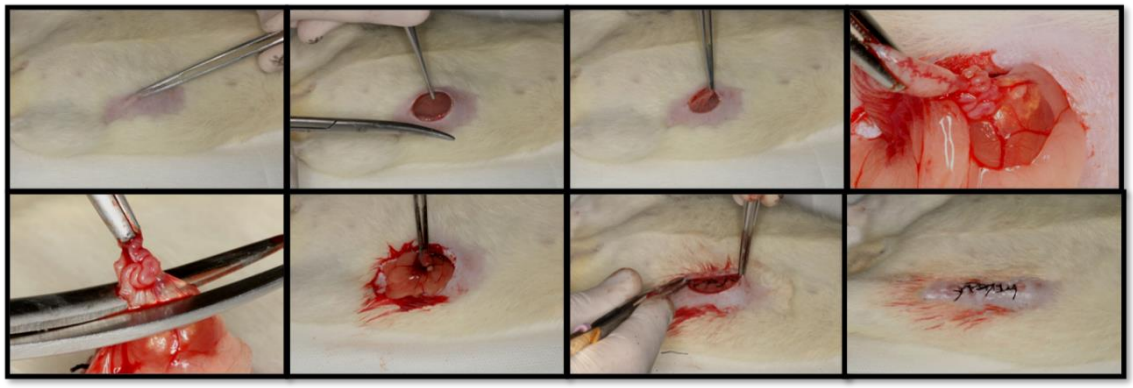
Foi realizado em cada período experimental (t=0, 60, 88) o controle de peso, glicemia e índice de Lee para acompanhamento do desenvolvimento das alterações metabólicas nos animais experimentais.

2.2.5 Ovariectomia

Após a anestesia com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) os animais foram imobilizados 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. Em

seguida, foram localizados os ovários e os cornos uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl^{tm} – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi feita a remoção dos ovários. Por fim, foi feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl^{tm} – Jhonson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (figura 7). As ratas do grupo sham foram submetidas ao mesmo procedimento, porém foi realizada apenas a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção.

Figura 7 - Técnica cirúrgica para remoção bilateral dos ovários.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

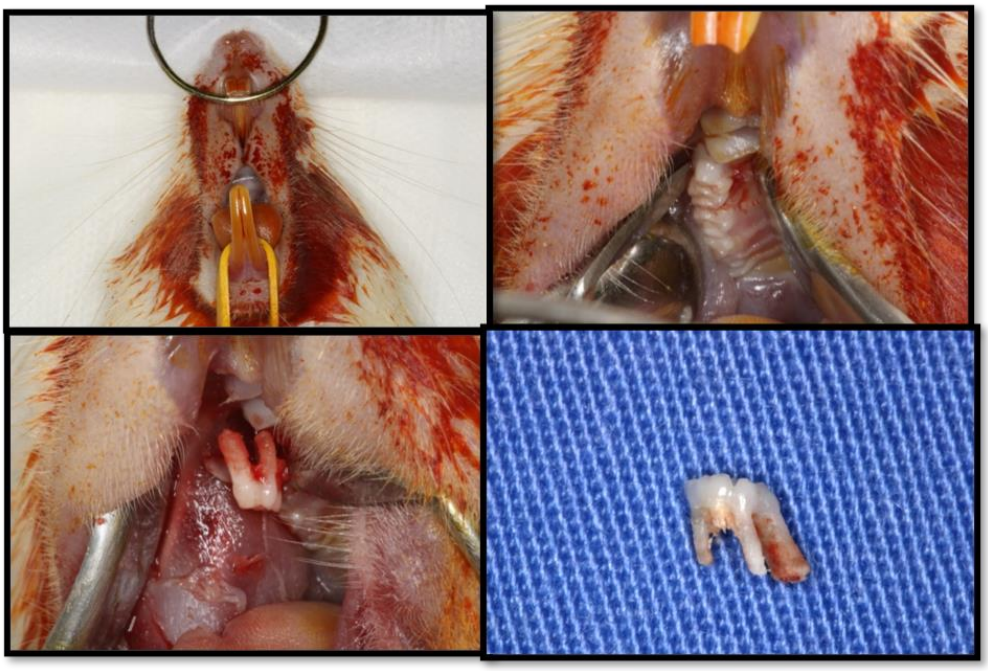
2.2.6 Técnica para extração dental

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

Após a sedação, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica confeccionada especialmente para procedimentos cirúrgicos em roedores, favorecendo a manutenção da cavidade bucal aberta e proporcionando um posicionamento adequado para o procedimento de exodontia, antissepsia da região com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Após antissepsia a exodontia dos primeiros molares superiores foram realizadas com o auxílio de um esculpidor Hollenbeck n° 3S (Quinelato, Rio Claro – SP), a diérese; sindesmotomia, em seguida a luxação do primeiro molar superior com o esculpidor de hollenbeck 3S utilizando o princípio de uso em forma de cunha e alavanca, para em seguida realizar a elevação do elemento dentário (exodontia), não havendo a necessidade de sutura após o procedimento de exodontia (figura 8).

Figura 8 - Técnica cirúrgica para exodontia do primeiro molar superior direito dos animais experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

2.2.7 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis na maxila

Imediatamente após a extração do primeiro molar, com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear sobre o rebordo alveolar pós exodôntico de aproximadamente 0,5 cm de comprimento na região do rebordo alveolar pós exodôntico e em seguida o tecido mole foi descolado em espessura total e afastado com o auxílio de um esculpidor de hollenbeck, expondo o tecido ósseo para a instalação do implante.

Foram instalados 96 implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos,Itu, São

Paulo, Brasil), com diâmetro de 1,4 mm e altura de 2,7 mm, esterilizados por raios gama (Figura 7), submetidos (grupos experimental) ou não (grupo controle) à funcionalização das superfícies com teriparatida. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,2 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 2,0mm, com travamento e estabilidade inicial.

Figura 9 - Imagem representativa das dimensões do implante instalado nas maxilas dos animais (1.4mmX2.7mm)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Cada animal recebeu 1 implante na região do primeiro molar superior direito. Para o fechamento dos tecidos (síntese), foi utilizado o fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos (figura 9).
No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Figura 10 - Técnica para instalação de implante na região do primeiro molar superior dos animais experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

2.2.8 Tratamento medicamentoso sistêmico com risedronato de sódio

O risedronato de sódio foi administrado na dosagem de 0,7mg/kg, semanalmente, de acordo com as orientações na bula do medicamento, através de gavagem. O tratamento medicamentoso foi iniciado após 30 dias da cirurgia de exodontia e foi mantido ao longo de todo o experimento. Utilizando uma agulha curva de gavagem (Insight equipamentos), a medicação diluída em água foi administrada semanalmente. A agulha de gavagem é utilizada com o intuito de levar a medicação até próximo a região do esôfago. O volume final administrado foi de 0,3ml.

2.2.9 Análise biomecânica – torque de remoção

Após 28 dias da instalação dos implantes, os animais foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e as maxilas 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 registra o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

2.2.10 Análise Estatística

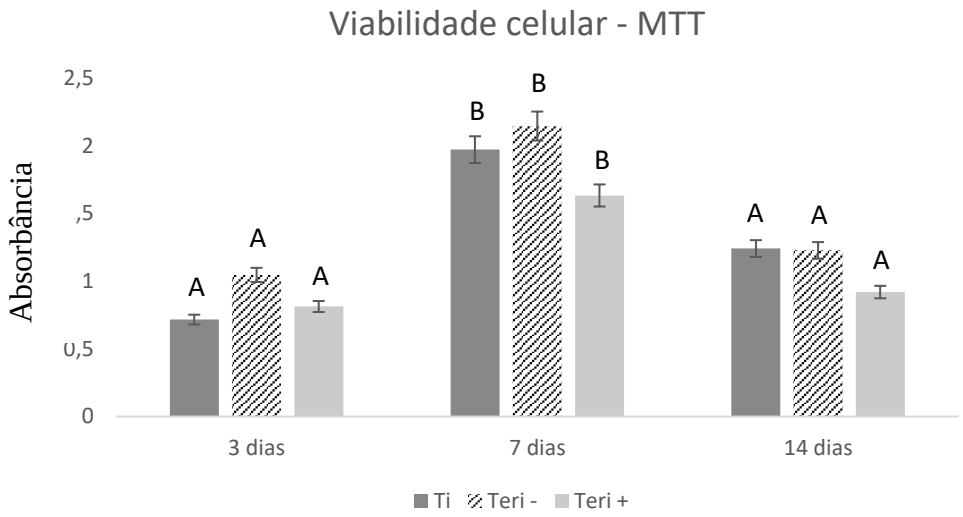
Os valores obtidos a partir da análise biomecânica foram submetidos a análise estatística pelo software GRaphPad Prisma 7.01. Para seleção do dado estatístico adequado foram realizados testes de homogeneidade e homocedasticidade (*Shapiro-Wilk*). Após confirmação da distribuição normal, foi realizado o teste one-way Anova para a comparação entre os resultados obtidos no grupos SHAM, SHAM/SM, OVX, OVX/SM, OVX/RIS e OVX/SM/RIS, seguido do pós-teste de *Tukey* quando necessário. Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de significância de 95% ($p<0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Determinação da viabilidade celular

Maior número de células viáveis foi encontrado aos 7 dias após a exposição à menor concentração de teriparatida (10μM) no grupo Teri -, diferenciando estatisticamente dos grupos controle (Ti) e teriparatida em maior concentração (Teri +) aos 3 e 14 dias.

Figura 11 - Gráfico referente à média dos resultados de viabilidade celular (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey)

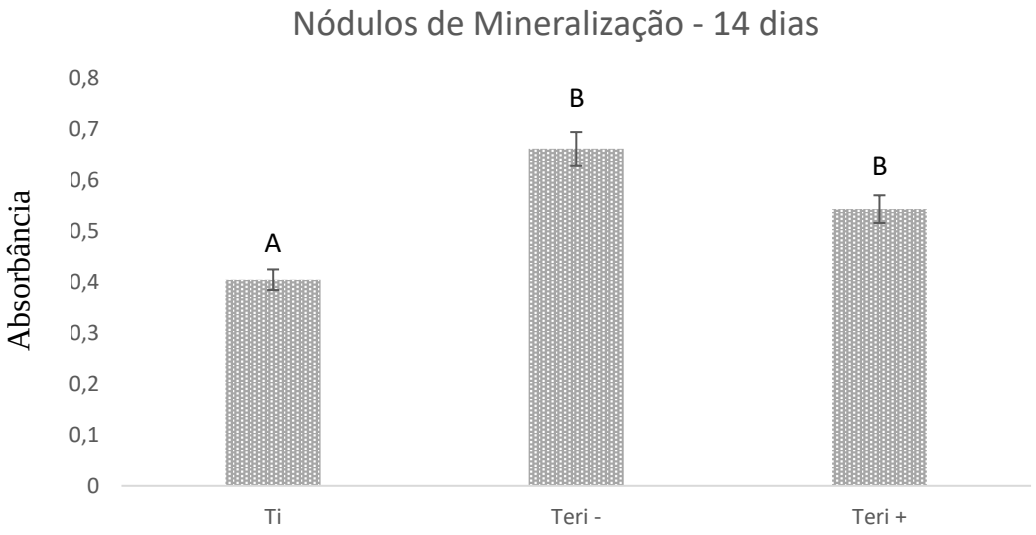


Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.2 Análise da formação de nódulos de mineralização

Maior quantidade de nódulos de mineralização aos 14 dias foi observada após a exposição à menor concentração de Teriparatida (10μM) no grupo Teri -, diferenciando estatisticamente do grupo controle (Ti).

Figura 12 - Gráfico referente à média dos resultados de formação de nódulos de mineralização frente à presença de teriparatida (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey)



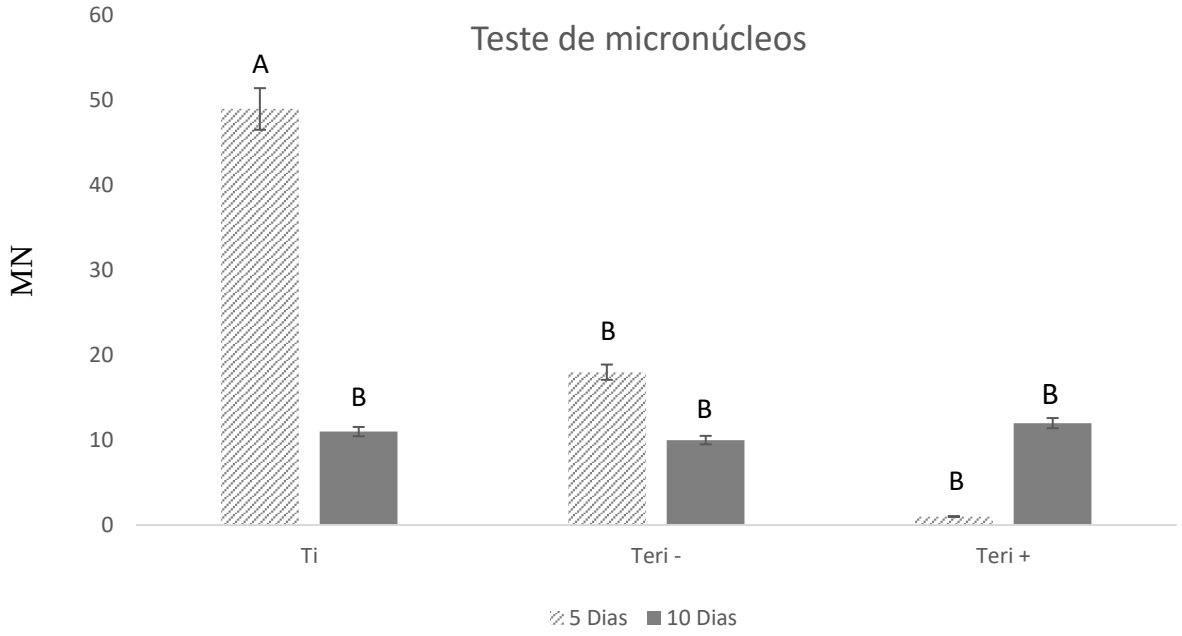
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.3 Teste de micronúcleos

Maior número de micronúcleos em células binucleadas foi encontrado no grupo controle (Ti) após o período de 5 dias, diferenciando estatisticamente do restante dos grupos, indicando maior dano nuclear das células mesenquimais expostas a essa superfície quando comparada às demais. O mesmo grupo apresentou redução drástica da quantidade de micronúcleos em células binucleadas após o período de 10 dias.

Ao comparar os grupos Teri – e Teri +, observamos maior número de micronúcleos em células binucleadas no grupo Teri – nos períodos de 5 e 10 dias.

Figura 13 - Gráfico referente à média dos resultados de genotoxicidade frente à presença de teriparatida (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.4 Dados clínicos

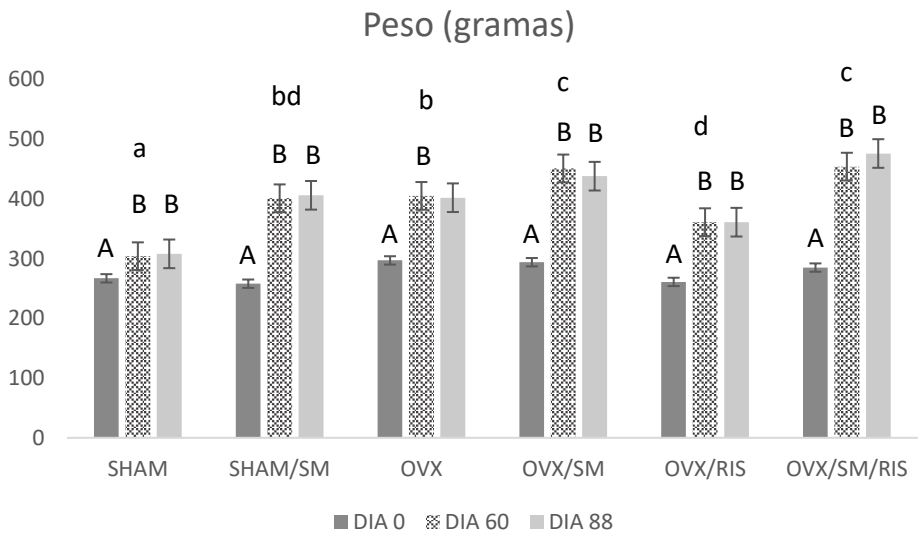
A cada período experimental (t=0, 60 e 88) foram feitas medidas de peso, glicemia em jejum e índice de lee para avaliação do desenvolvimento da síndrome metabólica nos grupos experimentais. A análise estatística demonstrou que as medidas sofreram uma variação significante de acordo com os períodos experimentais.

3.4.1 Peso

Ao avaliarmos a interação entre períodos experimentais de análise, notamos diferença estatisticamente significante entre o dia 0 e os dias 60 e 88, indicando que o tempo foi fator determinante para o ganho de massa corporal dos animais. Ao avaliarmos os valores de peso considerando as alterações sistêmicas, nota-se que o grupo controle (SHAM) difere estatisticamente de todos os demais grupos, no qual os animais apresentaram menor valor de peso. Quanto ao grupo SHAM/SM, menores valores de

peso foram observados quando comparado aos grupos OVX/SM e OVX/SM/RIS, se diferenciando estatisticamente destes grupos. O grupo OVX apresentou diferenças estatísticas quando comparado aos grupos OVX/RIS e OVX/SM/RIS. O grupo OVX/SM apresentou maiores valores de peso quando comparado ao grupo OVX/RIS, com diferença estatisticamente significante. Quando comparamos o grupo OVX/RIS eOVX/SM/RIS notamos maior valor para o grupo com alteração sistêmica, apresentando diferença estatisticamente significante entre os grupos (figura 11)

Figura 14 - Gráfico referente à média das medidas de peso (g) de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey)



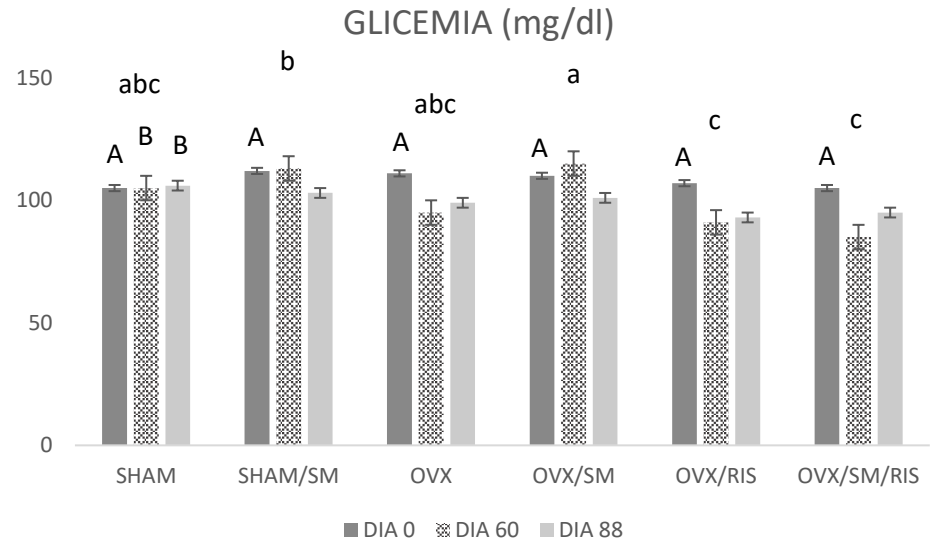
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.4.2 Glicemia

Ao avaliarmos a interação entre períodos experimentais de análise, notamos diferença estatisticamente significante entre o dia 0 e os dias 60 e 88, sugerindo que o tempo foi fator determinante para a elevação dos valores de glicemia em jejum. Ao avaliarmos os valores de glicemia considerando as alterações sistêmicas observamos que o grupo SHAM não diferiu estatisticamente dos demais grupos experimentais. No grupo SHAM/SM maiores valores de glicemia foram obtidos, diferindo estatisticamente dos

grupos OVX/RIS e OVX/SM/RIS. O grupo OVX não apresentou diferenças estatísticas em comparação com outros grupos. Valores superiores de glicemia foram obtidos pelo grupo OVX/SM quando comparado aos grupos OVX/RIS e OVX/SM/RIS, com diferença estatisticamente significante (figura 12).

Figura 15 - Gráfico referente à média das medidas de glicemia (mg/dl) de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey).



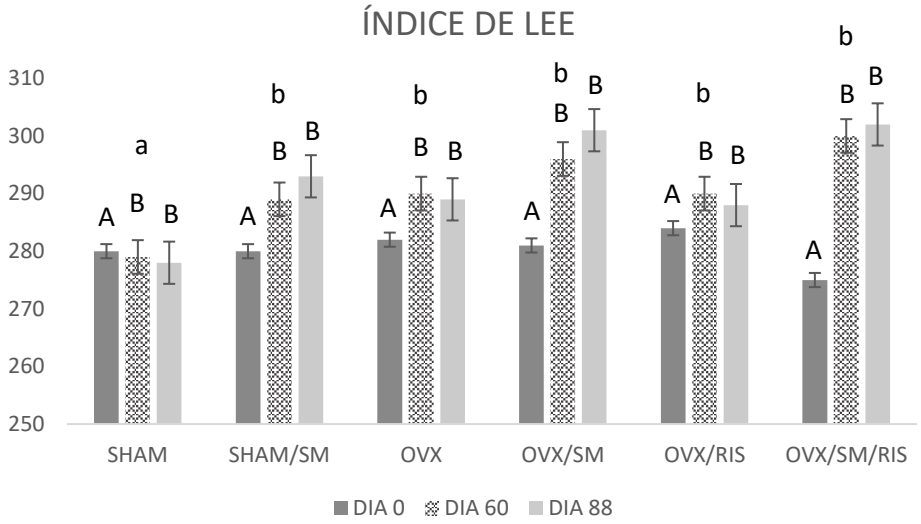
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.4.3 Índice de Lee

Ao avaliarmos a interação entre períodos experimentais de análise, observamos diferença estatisticamente significante entre o dia 0 e os dias 60 e 88, sugerindo que o tempo foi fator determinante para a elevação do índice de massa corpórea em todos os grupos. Ao avaliarmos os valores de índice de lee (IL), considerando as alterações sistêmicas dos grupos, observamos que o grupo controle (SHAM) diferiu estatisticamente dos grupos restantes, no qual os animais apresentaram menor valor de IL. Os grupos SHAM/SM, OVX, OVX/SM, OVX/RIS e OVX/SM/RIS não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Vale destacar que o grupo OVX/SM atingiu o índice no valor de 300 ao final do experimento, correspondendo à obesidade dos animais desse grupo. O grupo OVX/SM/RIS atingiu valores correspondentes à

obesidade (≥300) no dia 60, momento da instalação dos implantes, e no final do experimento (figura 13).

Figura 16 - Gráfico referente à média do Índice de Lee de todos os grupos experimentais. Interação entre condição sistêmica e tempo está representada por letras maiúsculas. Interação entre condições sistêmicas está representada por letras minúsculas. (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.5 Análise biomecânica – torque de remoção

Os dados obtidos pela análise de contra torque demonstraram que síndrome metabólica não afetou negativamente a retenção biomecânica dos implantes osseointegráveis. Para apoiar essa hipótese, o torque de remoção do grupo SHAM/SM convencional se apresentou semelhante ao grupo SHAM convencional (SHAM/SM convencional = 3,06 N.cm versus SHAM convencional = 3,07 N.cm, p > 0,999). A funcionalização com teriparatida apresentou melhor desempenho na ausência de síndrome metabólica nos animais SHAM (SHAM teriparatida = 4,6 N.cm versus SHAM/SM teriparatida = 3,5 N.cm, p = 0,8336).

A deficiência de estrógeno, induzida pela ovariectomia, reduziu a retenção biomecânica no grupo OVX convencional, sendo o grupo com menor valor de torque de remoção (2,5 N.cm). É importante ressaltar que a funcionalização com teriparatida

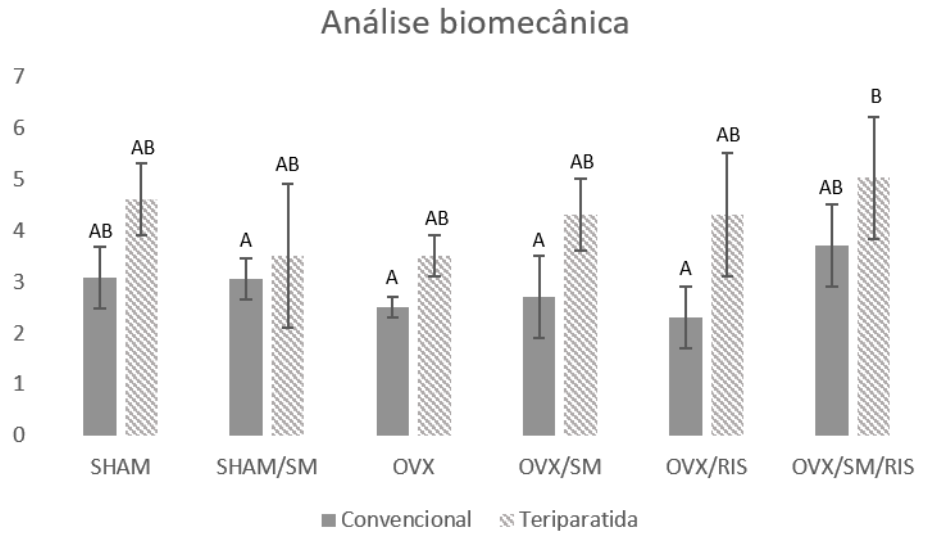
reverteu o impacto negativo da deficiência de estrógeno no torque de remoção para os níveis dos animais SHAM (OVX teriparatida = 4,0 N.cm).

Quando observamos os valores de OVX/SM convencional, notamos ligeira melhora dos parâmetros biomecânicos quando comparado ao grupo OVX convencional (OVX/SM convencional = 2,7 N.cm versus OVX convencional = 2,5 N.cm, p > 0,99). A teriparatida incorporada à superfície dos implantes promoveu significativa melhora, elevando o valor do torque de remoção de OVX/SM teriparatida (4,3 N.cm).

O tratamento com risedronato de sódio não foi suficiente para reverter os danos provocados pela deficiência de estrógeno no grupo OVX/RIS convencional, apresentando valores semelhantes ao grupo OVX sem tratamento (OVX/RIS convencional = 2,8 N.cm versus OVX convencional = 2,5 N.cm. A funcionalização com teriparatida promoveu significativa melhora dos valores de torque de remoção do grupo OVX/RIS teriparatida (OVX/RIS convencional = 2,8 N.cm versus OVX/RIS teriparatida = 4,3 N.cm, p = 0,103).

Quando comparamos os grupos OVX/SM/RIS convencional com e sem funcionalização, notamos uma expressiva melhora nos valores de torque de remoção dos implantes funcionalizados com teriparatida (OVX/SM/RIS convencional = 3,7 N.cm versus OVX/SM/RIS teriparatida = 5,02 N.cm, p = 0,45).

Figura 17 - Avaliação biomecânica do torque de remoção dos grupos experimentais: SHAM, SHAM/SM, OVX, OVX/SM, OVX/RIS e OVX/SM/RIS. Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística (p<0,05, ANOVA e pós teste de Tukey)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

4 DISCUSSÃO

A determinação da concentração efetiva de teriparatida pelo experimento de cultura de células se mostrou promissora, uma vez que através dessa análise foram obtidas informações de grande relevância para este estudo. Embora os resultados do teste de micronúcleos mostrem um maior dano nuclear às células mesenquimais que foram expostas à teriparatida em menor concentração, não é determinante que seja maléfico ao tecido ósseo a utilização do medicamento em questão, uma vez que os testes de viabilidade celular e nódulos de mineralização demonstraram resultados favoráveis à menor concentração de teriparatida aos 7 e aos 14 dias respectivamente. Comprovando essa informação, observamos neste estudo que a teriparatida de forma local proporcionou melhores condições de reparo periimplantar em todos os grupos experimentais, exibindo valores de torque de remoção superiores em todos os grupos em que foram utilizados os implantes funcionalizados.

A deficiência de estrógeno, condição adquirida por mulheres após a menopausa, provoca deterioração da microarquitetura óssea, podendo levar a osteoporose.[46] Essa condição se estende aos ossos da maxila e mandíbula e, como consequência, leva a perda de dentes. A osteoporose promove drástica diminuição da altura da crista alveolar em mulheres após a menopausa[47]. Além disso, a deterioração da microarquitetura óssea, característica da osteoporose, parece influenciar negativamente a osseointegração de implantes dentários em animais e humanos[48,49]. Sustentando esses achados, relatamos neste estudo que os animais submetidos à ovariectomia, e assim, portadores de deficiência de estrógeno, apresentaram menor estabilidade biomecânica representada pelos menores valores de torque de remoção dos implantes (OVX convencional = 2,5 N.cm). Ainda, a deficiência de estrógeno parece influenciar na fisiologia dos adipócitos, provocando alterações no perfil lipídico e acúmulo predominante de gordura abdominal, levando a um aumento da prevalência de síndrome metabólica em mulheres na pós menopausa. A síndrome metabólica de refere a um conjunto distúrbios que ocorrem juntos, incluindo pressão alta, níveis elevados de insulina no sangue, aumento de gordura abdominal e níveis altos de colesterol LDL. Esse conjunto de alterações promove uma inflamação sistêmica que pode ativar o processo de reabsorção óssea[50], podendo prejudicar o metabolismo ósseo, bem como o processo de osseointegração. No entanto, estudos

prévios investigaram a associação entre síndrome metabólica e osteoporose, mas os resultados foram inconclusivos.[51]

A partir dos dados clínicos obtidos neste estudo, foi possível observar que a remoção dos ovários potencializou o ganho de massa corporal dos animais que também foram acometidos pela síndrome metabólica, uma vez que os valores médios de peso dos grupos OVX/SM e OVX/SM/RIS se mostraram superiores, apresentando diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos grupos restantes. Essa condição é refletida no índice de lee dos animais desses grupos, no qual atingiram valores acima de 300, caracterizando obesidade. Diferentemente da situação encontrada no grupo SHAM/SM, no qual não foi realizada a indução à deficiência de estrógeno e os valores de índice de lee se apresentaram dentro da normalidade. Os dados clínicos de glicemia não indicaram alterações no metabolismo da insulina, não sugerindo interferência sobre o reparo periimplantar.

A alteração metabólica não interferiu na estabilidade biomecânica dos implantes instalados no grupo SHAM/SM, apresentando valores semelhantes aos obtidos pelo grupo SHAM (SHAM/SM convencional = 3,06 N.cm versus SHAM convencional = 3,07 N.cm). Ainda, quando associada a síndrome metabólica ao grupo OVX, os valores de torque de remoção para o grupo OVX/SM se apresentaram ligeiramente maiores, confirmando que a síndrome metabólica não promoveu piora do reparo periimplantar do ponto de vista biomecânico (OVX/SM convencional = 2,7 N.cm versus OVX convencional = 2,5 N.cm). Seguindo o mesmo padrão, os valores de torque de remoção do grupo OVX/SM/RIS se apresentaram superiores ao grupo OVX/RIS, no qual os animais não foram induzidos à síndrome metabólica (OVX/SM/RIS convencional = 3,7 versus OVX/RIS convencional = 2,3 N.cm). Esses dados confirmam a hipótese de que um componente da síndrome metabólica (aumento da massa corporal) pode ter efeito protetor contra os malefícios da osteoporose[52].

Sendo a osteoporose um problema de saúde pública, o tratamento adequado para esta condição é de interesse mundial. Nas últimas duas décadas, uma série de terapias farmacológicas para osteoporose foram apresentadas, incluindo os anti-reabsortivos, medicamentos de primeira escolha para a terapia anti-osteoporose[53]. O risedronato de sódio é um bifosfonato oral amplamente prescrito para o tratamento da osteoporose pós menopáusica. Estudos demonstraram sua expressiva eficácia na prevenção de fraturas em mulheres na pós menopausa[54] através do seu mecanismo de ação anti-reabsortivo, que atua reduzindo a taxa de remodelação óssea e suprimindo a ação dos osteoclastos. Embora

seu desempenho seja favorável na prevenção de fraturas e manutenção de densidade mineral óssea, o uso dos bifosfonatos tem sido associado ao desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares, uma vez que esses agentes podem diminuir o suprimento sanguíneo através da indução da apoptose de células endoteliais, prejudicando a angiogênese.[55] Além disso, a ausência da diferenciação e função dos osteoclastos afeta a liberação de citocinas e fatores de crescimento derivados de osteoclastos responsáveis por ativar a formação óssea. Dessa forma, o uso do risedronato pode inibir o turn over ósseo e levar ao quadro de osteonecrose.[56] Confirmando esses achados, os animais que foram induzidos à deficiência de estrógeno e tratados com risedronato obtiveram os menores valores de torque de remoção, indicando piora do processo de reparo peri-implantar (OVX/RIS = 2,3 N.cm). Por outro lado, quando associamos o uso de implantes funcionalizados com teriparatida, um anabólico ósseo, os valores de torque de remoção tiveram um aumento relevante em animais tratados com risedronato de sódio (OVX/RIS teriparatida = 4,3 N.cm versus OVX/RIS convencional = 2,3 N.cm). O efeito preventivo do risedronato de sódio em fraturas ósseas é incontestável, sendo uma medicação viável para portadores da osteoporose. No entanto, é evidente que sua ação antireabsortiva traz prejuízos ao metabolismo ósseo durante o processo de reparo peri-implantar, uma vez que os osteoclastos tem importante papel no processo de reparo ósseo. Os dados obtidos por esse estudo evidenciam que a associação de um anabólico ósseo de forma local, ou seja, incorporado à superfície do implante, conseguem neutralizar os efeitos maléficos produzidos pelo bifosfonato nos ossos maxilares, sendo uma estratégia interessante para melhorar as respostas de formação óssea em indivíduos que fazem o uso de risedronato de sódio e necessitam de tratamento com implantes dentários. A teriparatida tem eficácia comprovada na redução do risco de fratura vertebral e não vertebral em mulheres na pós-menopausa com osteoporose[57]. Em um estudo de Anagnostis em 2018[58], foi demonstrado que a teriparatida apresentou resultados mais favoráveis que os bifosfonatos (alendronato e risedronato) quanto ao aumento da densidade mineral óssea e melhora da arquitetura óssea, tendo maior sucesso em reduzir o risco de fraturas. Estudos do nosso grupo mostram que a teriparatida tem um efeito favorável sobre o processo de reparo ósseo alveolar ou periimplantar, quando os animais são submetidos à orquiectomia, predispondo a condição de osteoporose no sexo masculino.[59,61]

Ademais, a teriparatida foi associada à maior resolução de defeitos ósseos e cicatrização acelerada de feridas ósseas na cavidade oral em comparação com o placebo, um efeito promissor em casos de osteonecrose mandibular.[62] Esses estudos sustentam os

resultados obtidos pela análise biomecânica deste estudo, na qual o grupo OVX/SM/RIS, no qual foi utilizado implantes funcionalizados com teriparatida, obteve valores superiores de torque de remoção quando comparados ao grupo em que foi utilizado implantes convencionais (OVX/SM/RIS teriparatida = 5,02 N.cm versus OVX/SM/RIS convencional = 3,7 N.cm). Além disso, o grupo OVX/SM/RIS com implantes funcionalizados com teriparatida atingiu o maior valor de torque de remoção quando comparado aos demais grupos do experimento, apresentendo diferença estatística com relação aos grupos SHAM/SM convencional (p=0,04), OVX convencional (p=0,001), OVX/SM convencional (p = 0,007) e OVX/RIS convencional (p=0,002).

Segundo o entendimento destes achados, podemos concluir que apenas os bifosfonatos orais não são suficientes para promover a melhora do reparo periimplantar em ratas submetidas à ovariectomia, de modo que os valores de torque de remoção do grupo OVX/RIS convencional se apresentou inferior ao grupo OVX sem tratamento. No entanto, a associação de risedronato de sódio à administração local de teriparatida pareceu conferir os melhores resultados, que são representados pelos maiores valores de torque de remoção do grupo OVX/SM/RIS teriparatida, superando o valores obtidos pelo grupo SHAM. Além disso, os valores de torque de remoção de todos os grupos com implantes funcionalizados com teriparatida foram superiores aos grupos que utilizaram implantes convencionais.

A utilização da teriparatida como meio de melhorar o reparo periimplantar é promissora não apenas em casos em que há comprometimento ósseo por deficiência de estrógeno, mas também por indivíduos saudáveis, uma vez que a administração tópica do medicamento é localizada e não traz efeitos sistêmicos.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a associação sistêmica do fármaco anti-reabsortivo ao anabólico ósseo de forma tópica mostrou-se bastante promissora. Mais estudos são necessários para que estas respostas sejam melhor caracterizadas do ponto de vista biológico e funcional.

Vale destacar que a superfície funcionalizada com o anabólico ósseo apresentou melhor desempenho clínico quando comparada à superfície convencional, mostrando-se mais eficiente em todos grupos experimentais avaliados neste estudo.

REFERÊNCIAS

ELANI, H. W.; STARR, J. R.; DA SILVA, J. D.; GALLUCCI, G. O. Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026. **Journal of dental research**, v. 97, n. 13, p 1424–1430, 2018.

BRÅNEMARK, R.; BRÅNEMARK, P. I.; RYDEVIK, B.; MYERS, R. R. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. **Journal of rehabilitation research and development**, v. 38, n. 2, p. 175–181, 2001.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **Int J Prosthodont**, v. 11, p. 391-401, 1998

BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I.; LANG, NP.; LINDHE, J. *De novo* alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clin Oral Implants Res.** v. 143, p. 251-62, 2003.

MEYER, U.; JOOS, U.; MYTHILI, J.; STAMM, T.; HOHOFF, A.; FILLIES, T.; STRATMANN, U.; WIESMANN, HP. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. **Biomaterials**. V. 25, p. 1959-1967, 2004

WRIGHT, N. C.; LOOKER, A. C.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R.; DELZELL, E. S.; RANDALL, S.; DAWSON-HUGHES, B. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 11, p. 2520–2526, 2014.

ROELOFS, K.; THOMPSON, S.; GORDON, S.; ROGERS, M. J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 6222s-6230, 2006.

HENRIKSEN, K.; NEUTZSKY-WULFF, A. V.; BONEWALD, L. F.; KARSDAL, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. **Bone**, v. 44, n, 6, p. 1026-1033, 2009.

KHANAM, M. A.; QIU, C.; LINDEBOOM, W.; STREATFIELD, P. K.; KABIR, Z. N.; WAHLIN, Å. The metabolic syndrome: prevalence, associated factors, and impact on survival among older persons in rural Bangladesh. **PloS one**, v. 6, n. 6, e20259, 2011.

CARR, M. C.; KIM, K. H.; ZAMBON, A.; MITCHELL, E. S.; WOODS, N. F.; CASAZZA, C. P.; PURNELL, J. Q.; HOKANSON, J. E.; BRUNZELL, J. D.; SCHWARTZ, R. S. Changes in LDL density across the menopausal transition. **J Investig Med**, v. 48, p.245–250, 2000.

KIM, K. C.; SHIN, D. H.; LEE, S. Y.; IM, J. A.; LEE, D. C. Relation between obesity and bone mineral density and vertebral fractures in Korean postmenopausal women. **Yonsei medical journal**, v. 51, n.6, p. 857–863, 2010.

WONG, S. K.; CHIN, K. Y.; SUHAIMI, F. H.; AHMAD, F.; IMA-NIRWANA, S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. **Nutrients**, v. *8*, n. 6, p. 347, 2016.

DA SILVA, V. N.; FIORELLI, L. N.; DA SILVA, C. C.; KUROKAWA, C. S.; GOLDBERG, T. B. Do metabolic syndrome and its components have an impact on bone mineral density in adolescents?. **Nutrition & metabolism**, v. 14, p. 1, 2017.

KOPELMAN, PG. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000.

HOTAMISLIGIL, GS. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n.7121, p. 860- 867, 2006.

LEITE, F. R.; DE AQUINO, S. G.; GUIMARÃES, M. R.; CIRELLI, J. A.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; JUNIOR, C. R. Relevance of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and nod expressions induced by TLR and IL-1R signaling in bone marrow stromal cells. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2015.

WONG, S. K., CHIN, K. Y., SUHAIMI, F. H., AHMAD, F., & IMA-NIRWANA, S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 6, p. 347, 2016.

WONG, S. K.; CHIN, K. Y.; SUHAIMI, F. H.; AHMAD, F.; JAMIL, N. A.; IMA-NIRWANA, S. Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet in a rat model. **Biomed Pharmacother**, v. 98, p. 191–200, 2018.

ZHOU, J.; ZHANG, Q.; YUAN, X.; WANG, J.; LI, C.; SHENG, H.; QU, S.; LI, H. Association between metabolic syndrome and osteoporosis: a meta-analysis. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 30-35, 2013.

PABST, A. M.; ZIEBART, T.; ACKERMANN, M.; KONERDING, M. A.; WALTER, C. Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an in vivo 3D Matrigel assay. **Clinical oral investigations**, v. 18, n.3, p. 1015–1022, 2014.

PETCU, E. B.; IVANOVSKI, S.; WRIGHT, R. G.; SLEVIN, M.; MIROIU, R. I.; BRINZANIUC, K. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): an anti-angiogenic side-effect?. **Diagnostic pathology**, v. 7, p. 78, 2012.

SHARMA, D.; IVANOVSKI, S.; SLEVIN, M.; HAMLET, S.; POP, T. S.; BRINZANIUC, K.; PETCU, E. B.; MIROIU, R. I. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. **Vascular cell**, v. 5, n.1, p. 1, 2013.

WEHRHAN, F.; STOCKMANN, P.; NKENKE, E.; SCHLEGEL, K. A.; GUENTSCH, A.; WEHRHAN, T.; NEUKAM, F. W.; AMANN, K. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 112, n.2, p. 216–221, 2011

STRESING, V.; FOURNIER, P. G.; BELLAHCÈNE, A.; BENZAÏD, I.; MÖNKKÖNEN, H.; COLOMBEL, M.; EBETINO, F. H.; CASTRONOVO, V.; CLÉZARDIN, P. (2011). Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. **Bone**, v. 48, n.2, p. 259–266, 2011.

MARCO, F.; MILENA, F.; GIANLUCA, G.; VITTORIA, O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 36, n.7-8, p. 630–644, 2005.

TRINO, L. D.; BRONZE-UHLE, E. S.; RAMACHANDRAN, A.; LISBOA-FILHO, P. N.; MATHEW, M. T.; GEORGE, A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 81, p. 26–38, 2018.

NIIMI, R.; KONO, T.; NISHIHARA, A.; HASEGAWA, M.; MATSUMINE, A.; KONO, T.; SUDO, A. Analysis of daily teriparatide treatment for osteoporosis in men. **Osteoporos Int**, v. 26, n. 4, p. 1303-1309, 2015.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 142, p. 155–170.

LEE, J. J.; CHENG, S. J.; JENG, J. H.; CHIANG, C. P.; LAU, H. P.; KOK, S. H. Successful treatment of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible with adjunctive teriparatide therapy. **Head & neck**, v. 33, n. 9, p. 1366–1371, 2011.

TSAI, K. Y.; HUANG, C. S.; HUANG, G. M.; YU, C. T. More on the resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **The Journal of rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 675–676, 2010.

CHEUNG, A.; SEEMAN, E. Teriparatide therapy for alendronate-associated osteonecrosis of the jaw. **N Engl J Med**, v. 363, n. 25, p. 2473–2474, 2010.

HARPER, R. P.; FUNG, E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 3, 573–580, 2007.

KWON, Y. D.; LEE, D. W.; CHOI, B. J.; LEE, J. W.; KIM, D. Y. Short-term teriparatide therapy as an adjunctive modality for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Osteoporosis international** : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, v. 23, n. 11, p. 2721–2725, 2012.

KUROSHIMA, S.; KOVACIC, BL.; KOZLOFF, KM.; MCCAULEY, LK.; YAMASHITA, J. Intraoral PTH administration promotes tooth extraction socket healing. **J Dent Res**, v. 92, n. 6, p. 553-559, 2013.

GULATI, K.; KOGAWA, M.; PRIDEAUX, M.; FINDLAY, DM.; ATKINS, GJ.; LOSIC, D. Drugreleasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 1, n. 69, p. 831-840, 2016.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, LP.; PRADO, FB.; GARCIA, IR.; OKAMOTO, R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 6, p. 798-805, 2015.

.HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; CORRALES UREÑA, Y. R.; MACHADO, D.; LANCELLOTI, M.; PINHEIRO, M. P.; RISCHKA, K.; LISBOA-FILHO, P. N.; COTTA, M. A. Electrostatic immobilization of antimicrobial peptides on polyethylenimine and their antibacterial effect against Staphylococcus epidermidis. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 164, p. 370–378, 2018.

TRINO, LD.; DIAS, LFG.; ALBANO, LGS.; BRONZE-UHLE, ES.; RANGEL, EC.; GRAEFF, CFO.; LISBOA-FILHO, PN.; Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. **Ceramics International**, v. 44, n. 4, p. 4000-4008, 2018.

ROSA, ML.; BELOTI, MM.; PRANDO, N.; QUEIROZ, RH.; DE OLIVEIRA, PT.; ROSA, AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 205-211, 2008.

PACZESNY, S.; HAKIM, F. T.; PIDALA, J.; COOKE, K. R.; LATHROP, J.; GRIFFITH, L. M.; HANSEN, J.; JAGASIA, M.; MIKLOS, D.; PAVLETIC, S.; PARKMAN, R.; RUSSEK-COHEN, E.; FLOWERS, M. E.; LEE, S.; MARTIN, P.; VOGELSANG, G.; WALTON, M.; SCHULTZ, K. R. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. Biology of blood and marrow transplantation. **Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 5, p. 780–792, 2015.

DE ANDRADE, D. P.; DE VASCONCELLOS, L. M.; CARVALHO, I. C.; FORTE, L. F.; DE SOUZA SANTOS, E. L.; PRADO, R. F.; SANTOS, D. R.; CAIRO, C. A.; CARVALHO, Y. R. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 56, p. 538–544, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. **Mem. Univer.Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1922.

GOMEZ-SMITH, M.; KARTHIKEYAN, S.; JEFFERS, M. S.; JANIK, R.; THOMASON, L. A.; STEFANOVIC, B.; CORBETT, D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiology & behavior**, v. 167, p. 382–391, 2016.

CARILLON, J.; ROMAIN, C.; BARDY, G.; FOURET, G.; FEILLET-COUDRAY, C.; GAILLET, S.; LACAN, D.; CRISTOL, JP.; ROUANET, JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 254-261, 2013.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids**. Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 1, a031211, 2018.

WACTAWSKI-WENDE, J.; HAUSMANN, E.; HOVEY, K.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; GENCO, R. J. The Association Between Osteoporosis and Alveolar Crestal Height in Postmenopausal Women. **Journal of periodontology**, v. 76, Suppl 11S, p. 2116–2124, 2005.

KELLER, J. C.; STEWART, M.; ROEHM, M.; SCHNEIDER, G. B. Osteoporosis-like bone conditions affect osseointegration of implants. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 19, n. 5, p. 687–694, 2004.

TSOLAKI, I. N.; MADIANOS, P. N.; VROTSOS, J. A. Outcomes of dental implants in osteoporotic patients. A literature review. **Journal of prosthodontics**, vol. 18, n. 4, p. 309-323, 2009.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, 943162, 2014.

FODOR, D.; VESA, S.; ALBU, A.; SIMON, S.; CRACIUN, A.; MUNTEAN, L. The relationship between the metabolic syndrome and its components and bone status in postmenopausal women. **Acta physiologica Hungarica**, v. 101, n. 2, p. 216–227, 2014.

NGUYEN, T.V.; SAMBROOK, P.N.; EISMAN, J.A. Bone Loss, Physical Activity, and Weight Change in Elderly Women: The Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 1458-1467, 1998.

ROUX, C. Postmenopausal osteoporosis: current treatment. **Rev Med Interne**, v**.** 25 Suppl 5, S568-72, 2004.

FOURNIER, P.; BOISSIER, S.; FILLEUR, S.; GUGLIELMI, J.; CABON, F.; COLOMBEL, M.; CLÉZARDIN, P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. **Cancer research**, v. 62, n. 22, p. 6538–6544, 2002.

BROOKS, JK.; GILSON, AJ.; SINDLER, AJ.; ASHMAN, SG.; SCHWARTZ, KG.; NIKITAKIS, NG. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v. 103, n. 6, p. 780-786, 2007.

NEER, R. M.; AND SWAN Investigators. Bone loss across the menopausal transition. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 66-71, 2010.

ANAGNOSTIS, P.; GKEKAS, N. K.; POTOUPNIS, M.; KENANIDIS, E.; TSIRIDIS, E.; GOULIS, D. G. New therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas**, v. 120, p. 1–6, 2019.

DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA PUTTINI, I.; SILVA GOMES-FERREIRA, P. H.; PALIN, L. P.; MATSUMOTO, M. A.; OKAMOTO, R. Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchiectomized rats. **Clinical oral investigations**, v. 23, n.5, p. 2313–2322, 2019.

DE OLIVEIRA PUTTINI, I.; GOMES-FERREIRA, P.; DE OLIVEIRA, D.; HASSUMI, J. S.; GONÇALVES, P. Z.; OKAMOTO, R. Teriparatide improves alveolar bone modelling after tooth extraction in orchiectomized rats. **Archives of oral biology**, v. 102, p. 147–154, 2019.

GOMES-FERREIRA, P. H. S.; DE OLIVEIRA, D.; FRIGÉRIO, P. B.; DE SOUZA BATISTA, F. R.; GRANDFIELD, K.; OKAMOTO, R. Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchiectomized rats. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 31, n.9, p. 1807–1815, 2020.

BASHUTSKI, J. D.; EBER, R. M.; KINNEY, J. S.; BENAVIDES, E.; MAITRA, S.; BRAUN, T. M.; GIANNOBILE, W. V.; MCCAULEY, L. K. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 25, p. 2396–2405, 2010.

ANEXOS

Anexo A – Comitê de ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação do reparo ósseo após a instalação de implantes funcionalizados com medicação anabólica associada à administração sistêmica de antireabsortivo em ratas com deficiência de estrógeno 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