

GABRIEL MULINARI DOS SANTOS

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar em ratas hipertensas e com deficiência de estrógeno, após ação sinérgica de Losartan e Alendronato de Sódio

GABRIEL MULINARI DOS SANTOS

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar em ratas hipertensas e com deficiência de estrógeno, após ação sinérgica de Losartan e Alendronato de Sódio

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237c Santos, Gabriel Mulinari dos.
Caracterização do tecido ósseo peri-implantar em ratas hipertensas e com deficiência de estrógeno, após ação sinérgica de losartan e alendronato de sódio / Gabriel Mulinari dos Santos. - Araçatuba, 2021
42 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Osso e ossos 2. Hipertensão 3. Ratos endogâmicos SHR 4. Anti-hipertensivos 5. Implantes dentários 6. Losartan I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

A **Deus**, por guiar e iluminar meus passos, transformando os obstáculos em grandes oportunidades e por sempre me cercar de pessoas boas.

Também dedico esse momento as pessoas mais importantes da minha vida, os quais foram a base de tudo que me formei, aqueles que fundamentam a minha história: **a minha família**.

A meu pai, **Jairo dos Santos**, e minha mãe, **Arleide Mulinari dos Santos**, por me amarem e me criarem buscando oferecer sempre o melhor. Se hoje cheguei até aqui, devo a eles, pois se privaram de muitas coisas para me dar o melhor para o meu futuro. Sem esse amor e cuidado, este trabalho não seria possível. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre cuidar de cada detalhe do meu caminho e me cercar de pessoas boas.

A minha orientadora, **Professora Dra. Roberta Okamoto**, pela paciência, orientação, humanidade e profundo conhecimento compartilhado. Obrigado pelo estímulo ao meu crescimento na vida acadêmica e por não poupar esforços em me ajudar. Também por proporcionar a maior experiência de minha vida na pós-graduação! Agradeço por tudo, professora! A senhora sempre serei grato!

Ao **Professor Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, por desde o início ter confiado em mim. Também incentivado nos horizontes acadêmicos, por todas as orientações e ensinamentos. Acima de tudo, obrigado por ser exemplo a ser seguido como profissional e também como pessoa. Espelho-me no senhor e tenho o senhor como referência! Eternamente grato, professor!

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin** que além da docência me ensinou também a perseverança, dedicação, respeito e humildade. Agradeço por ser tão inspirador, sempre me ajudar e orientar! Sou muito grato ao senhor, professor!

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza** pela confiança, amizade e muito aprendizado. O senhor é exemplo de pessoa e profissional! Agradeço ao senhor por inúmeras cirurgias, conversas e corridas com tantos ensinamentos!

A **Profa. Dr. Juliana Zorzi Coléte** pela amizade e confiança. Sou grato pelo privilégio de ser seu amigo e companheiro de trabalho de alguém tão admirável. Agradeço por estar ao meu lado. Sou grato por sua vida, minha irmã!

Ao **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia**, pela amizade e sabedoria compartilhada em nossas conversas.

Aos demais **professores da Cirurgia: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani, Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Profa. Dra. Daniela Ponzoni, Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi e Prof. Dr. André Fabris** pelos ensinamentos e amizade.

As **alunas da nossa equipe**: Naara Monteiro, Jaqueline Hassumi, Jaqueline Silva, Leticia Pitol, Ana Claudia Ervolino, Paula Frigério, pela amizade, auxílio e boa vontade na realização deste trabalho, meu muito obrigado!

Meus sinceros agradecimentos aos amigos de pós-graduação, em especial ao **Fábio Souza Batista** e ao **Pedro H. Ferreira**, pela amizade, ajuda desde minha chegada em Araçatuba e execução deste trabalho. Também ao **André Oliva, Ciro Duailibe, Gustavo Momesso, Valthierre Nunes, João Paulo Bonardi, Leonardo Freitas, Erick Neiva, Jadson Conforte, William Ricardo, Mônica Munhõz, Tarik Polo, Jonathan Ribeiro, Sormani Queiroz, Juliana Zorzi, Ricardo Jacob, Luara Colombo, Lara Cervantes, Thiago Machado, Raquel Parra e Cássio Figueiredo** pela amizade e aprendizado na pós-graduação.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara** pela oportunidade de realização da minha pós-graduação em minha cidade natal.

Ao **CAOE - Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência**, cada um dos funcionários e pacientes, vocês me ensinaram sobre os valores da vida e possibilitaram minha formação cirúrgica.

Aos meus primos, **Neyliowan, Ralderkelys, Naysilyer e Maisa** por serem também amigos e irmãos. A minhas tias **Arlete, Arlene e Adelair**, por ser minhas segundas mães. Aos meus avós **Valdeci, Neiva e Maria Mulinari – in memoriam** que muito me ensinaram.

Ao meu amigo, **Rafael Brandão** por ter compartilhado grande parte de minha vida e oferecido uma amizade verdadeira. Agradeço-te, meu irmão!

A minha namorada e grande amor, **Amanda Paino Sant’Ana**, por me incentivar e ajudar de forma incondicional. Sou grato a Deus por sua vida! A ti o meu amor, admiração e meu muito obrigado! Te amo!

Aos meus pais, **Jairo dos Santos** e **Arleide Mulinari dos Santos**, por sempre me incentivarem e não medirem esforços para meu crescimento. Por tanto amor e ensinamento. Gratidão! Amo vocês!

Ao Laboratório de Multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado (processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011)”.
Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP pela utilização do Microscópio Confocal, especialmente a Elisabete Rosa Milani.

Ao Laboratório da Faculdade de Ciências – UNESP/Bauru, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Noronha.

Ao Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior - PAADES pela cordial oportunidade de docência na disciplina de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/Unesp, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin, a quem muito agradeço novamente.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do meu projeto de doutorado (Processo nº 2017/23082-3). Instituição admirável! Sou grato por todo apoio desde minha graduação!

Gratidão!

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento”.

Provérbios 3: 13

Santos GM. Caracterização do tecido ósseo peri-implantar em ratas hipertensas e com deficiência de estrógeno, após ação sinérgica de Losartan e Alendronato de Sódio [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2021.

RESUMO

Introdução: Este estudo visou caracterizar morfológica e estruturalmente o tecido produzido na interface osso-implante em ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas com implantes instalados em suas tíbias, e analisou como o tratamento associado de losartan sistêmico e alendronato de sódio local influenciou no reparo ósseo peri-implantar. **Material e Métodos:** Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR) que receberam losartan (30 mg/kg, p.o.). Após uma semana, implantes de titânio tratados (Medens, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) ou não com alendronato de sódio (ALE) foram instalados nas tíbias. Sessenta dias após a implantação, a estabilidade do implante foi avaliada pela medição de torque reverso, considerado como desfecho primário. A microtomografia computadorizada e a análise por confocal foram parâmetros secundários. **Resultados:** A ação sinérgica do losartan e do alendronato de sódio na superfície do implante aumentou o torque reverso no grupo SHR SHAM ALE. Enquanto a microtomografia também revelou maior extensão de contato entre osso e implante, volume ósseo e espessura trabecular nos animais SHR SHAM ALE. Por último, o losartan e o alendronato de sódio não alterou significativamente os parâmetros de osseointegração nas ratas ovariectomizadas. **Conclusões:** Os resultados apresentados sugerem que a ação sistêmica do losartan somada à atuação local do alendronato de sódio na superfície dos implantes melhoram os parâmetros de osseointegração em tíbias de ratas hipertensas e não ovariectomizadas.

Palavras-chave: Osso e ossos. Hipertensão. Ratos endogâmicos SHR. Anti-hipertensivos. Implantes dentários. Losartan.

Santos GM. Characterization of peri-implant bone tissue in hypertensive and estrogen-deficient rats after the synergistic action of Losartan and Alendronate Sodium [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2021.

ABSTRACT

Background: This study aims to characterize morphologically and structurally the tissue produced at the bone-implant interface in spontaneously hypertensive ovariectomized rats that will have implants placed in their tibiae, and to analyze how the associated treatment of systemic losartan and local sodium alendronate might influence the peri-implant bone healing. **Methods:** They are used spontaneously hypertensive (SHR) rats that received losartan (30 mg/kg, p.o.). After one week, titanium implants treated (Medens, Ribeirão, São Paulo, Brazil) or not with sodium alendronate (ALE) were installed in the tibiae. Sixty days after implantation, implant stability was assessed by measuring the removal torque considered the primary end point. Computed tomography and confocal analysis were secondary parameters. **Results:** The synergistic action of losartan and sodium alendronate on the implant surface increased the reverse torque in the SHR SHAM ALE group. While micro-tomography also revealed a greater extent of contact between bone and implant, bone volume and trabecular thickness in SHR SHAM ALE animals. Finally, losartan and sodium alendronate did not significantly alter osseointegration parameters in ovariectomized rats. **Conclusions:** The results presented suggest that systemic losartan plus the local action of sodium alendronate on implants surface improves osseointegration parameters in tibias of hypertensives and non-ovariectomized rats.

Keywords: Bone. Hypertension. Spontaneous hypertensive rats. Antihypertensives. Dental implants. Losartan.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Tratamento dos implantes com alendronato de sódio	20
FIGURA 2 – Sequência de instalação dos implantes	21
FIGURA 3 – Torque reverso	23
FIGURA 4 – Reconstrução microtomográfica	24

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Torque reverso	27
GRÁFICO 2 - Microtomografia computadorizada do osso peri-implantar	29
GRÁFICO 3 - Análise de epifluorescência do osso peri-implantar	30
GRÁFICO 4 - Aposição óssea mineral	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Divisão dos grupos de análises e distribuição das tíbias (n) por grupo 17

TABELA 2 - Divisão dos subgrupos, conforme cirurgia e tratamento submetidos 18

LISTA DE SIGLAS

ALE	Alendronato de sódio
SHR	Ratas espontaneamente hipertensas
OVX	Ovariectomia
µm	Micrometro

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	14
<u>2 METODOLOGIA</u>	17
<u>2.1 Ciclo estral e cirurgia de ovariectomia</u>	18
<u>2.2 Tratamento sistêmico com Losartan</u>	19
<u>2.3 Monitorização da pressão arterial sistólica</u>	19
<u>2.4 Tratamento dos implantes com Alendronato</u>	19
<u>2.5 Cirurgia de instalação dos implantes</u>	20
<u>2.6 Eutanásia</u>	22
<u>2.7 Grupo de análise Biomecânica</u>	22
<u>2.7.1 Torque reverso</u>	22
<u>2.8 Grupo de análises dos Tecidos Calcificados</u>	23
<u>2.8.1 Micro-CT</u>	23
<u>2.8.2 Microscopia por epifluorescência</u>	25
<u>3 RESULTADOS</u>	27
<u>3.1 Grupo Biomecânica</u>	27
<u>3.1.1 Torque reverso</u>	27
<u>3.2 Grupo Tecidos Calcificados</u>	28
<u>3.2.1 Micro-CT</u>	28
<u>3.3 Análise de epifluorescência</u>	29
<u>4 DISCUSSÃO</u>	32
<u>5 CONCLUSÃO</u>	34
<u>REFERÊNCIAS</u>	35
<u>ANEXOS</u>	42

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão e a osteoporose são as maiores causas de mortalidade e morbidade na saúde pública, sobretudo pelo aumento das doenças cardiovasculares e fraturas ósseas. (1) Essas duas alterações sistêmicas são comuns em pacientes com maior idade. Sendo assim, mulheres hipertensas na menopausa desenvolvem a osteoporose com maior frequência. (2) O mesmo estudo aponta uma possível associação entre hipertensão e osteoporose por dietas de baixa ingestão de cálcio. (2) Ambas as condições mostram ser responsáveis por promover alterações no metabolismo ósseo. (3–5) Isso também sugere que pacientes com essas alterações conjuntas no metabolismo ósseo possam ser de alto risco para a instalação de implantes. Dessa forma, estratégias terapêuticas devem ser adotadas a fim de controlar essas alterações, e melhorar o metabolismo ósseo comprometido.

Drogas anti-hipertensivas agem na supressão do sistema renina-angiotensina, para evitar a vasoconstrição e controlar a pressão arterial. (6) Porém, trabalhos recentes apontam que anti-hipertensivos também são capazes de agir no metabolismo ósseo. (7–9) Isso porque componentes do sistema renina-angiotensina são expressos no tecido ósseo. (10,11) Estudos prévios mostram que a angiotensina II aumenta a reabsorção óssea, pelo fato de aumentar a atividade osteoclástica elevando a expressão de RANKL. (7–9) Ademais, altera a diferenciação e maturação osteoblástica diminuindo a expressão de Runx2 e osteocalcina. (12) Com isso, destaque tem sido dado à atuação do losartan, antagonista de receptores tipo 1 da angiotensina II, amplamente utilizada no controle da hipertensão, (13) o qual também atua no metabolismo ósseo. (7,11,14) Efeitos anti-catabólicos foram encontrados, como aumento das propriedades físico-mecânicas do osso alveolar (15) e diminuição do risco de fraturas. (16) Em estudos pré-clínicos também mostrou melhorar o reparo de enxertos ósseos e consolidação de fraturas. (17,18) Esses achados são consistentes com estudos clínicos, onde assinalam que anti-hipertensivos podem ser responsáveis pelo aumento da taxa de sobrevivência de implantes osseointegráveis. (19,20) Seguindo os princípios do reparo ósseo, sugere-se que o losartan pode trazer benefícios para a osseointegração em condições ósseas comprometidas, como hipertensão e osteoporose.

Mulheres no período da menopausa apresentam deficiência de estrógeno.

(4) Por sua vez, a diminuição dos níveis de estrógeno leva ao aumento da expressão dos receptores tipo 1 da angiotensina II. (21) Esses receptores são fundamentais no sistema renina-angiotensina, visto que são responsáveis por mediar as funções da angiotensina II. (22) Contando com o aumento da expressão dos receptores tipo 1, também ocorre um aumento dos efeitos da angiotensina II, como: vasoconstrição, liberação de aldosterona, retenção de sódio e água, e consequente aumento da pressão arterial. (22) Esse também é um dos motivos para o aumento de arteriosclerose e doenças cardiovasculares em mulheres no período da menopausa. (23) Somado a isso, estudos indicam que o aumento da angiotensina II está associado com o aumento da reabsorção óssea (10,18). Seguindo esse princípio, o losartan mostrou melhorar os parâmetros ósseos estruturais em modelo de osteoporose. (24) Além disso, o losartan revelou ser capaz de reverter favoravelmente à osseointegração em ratos SHR, com o aumento da espessura óssea e de osso medular em contato com implantes em modelo de tíbias em ratos espontaneamente hipertensos. (25) O mesmo efeito anabólico foi visto em nosso último estudo onde o losartan mostrou melhorar a calcificação do osso alveolar de ratos normotensos. (26) Adicionalmente, esse anti-hipertensivo exibiu papel na redução da inflamação e aumento de fatores da formação óssea em modelo de ratos com periodontite. (27) Sendo assim, o losartan pode ter um papel adjuvante de reverter a deficiência de estrógeno e aumento da angiotensina II no metabolismo ósseo.

O alendronato de sódio é um medicamento amplamente utilizado no tratamento da osteoporose. (28,29) Trabalhos mostram que além da diminuição das fraturas ósseas, esse fármaco atua sobre o reparo ósseo alveolar. (30) Esse análogo do pirofosfato tem afinidade à hidroxiapatita, e por esse motivo, atua no tecido ósseo em formação. (31) Pesquisa recente assinala melhora dos parâmetros de osseointegração em modelos de osteoporose por meio de alendronato administrado via oral. (32) Porém seu uso clínico ainda é impreciso, tendo efeitos colaterais, como: náusea, vômito, dores gastrointestinais (33) e osteonecrose dos maxilares à longo prazo. (34) Sendo assim, têm se voltado para diferentes formas de administração deste fármaco, sendo a ação local uma das opções bastante promissoras. (30,32,35,36) Atuais revisões sistemáticas mostram que tanto quando

administrado no alvéolo, tanto como na superfície do implante, o alendronato é capaz de melhorar parâmetros de volume ósseo, contato osso-implante e biomecânicos na osseointegração, (32) também em osteoporose. (37) Além disso, seu uso tópico mostrou resultados benéficos no tratamento da periodontite. (38,39) Portanto, o uso local do alendronato revela-se como uma boa alternativa a ser utilizada em condições ósseas comprometidas.

Visto a grande incidência das duas condições: hipertensão e osteoporose, especialmente em mulheres, (2) justifica-se o uso dos modelos de SHR e ovariectomia para mimetizar essa condição sistêmica. (40) Nesse sentido, destacam-se fármacos para reverter esse metabolismo ósseo comprometido, como: losartan e alendronato de sódio. Ainda, deve-se levar em conta o benefício do losartan atuar favoravelmente no metabolismo ósseo. Seu efeito vasodilatador melhora a vascularização óssea após a instalação dos implantes. (17,41) Com isso, seu uso em ação sinérgica com o alendronato de sódio local, incorporado a superfície de implante, parece ser uma boa estratégia terapêutica neste modelo experimental e evitar os efeitos colaterais do alendronato. Corroborando com o estudo, outra pesquisa apontou aumento da osseointegração de implantes tratados com alendronato mais radiação ultravioleta. (42)

Recentemente vivemos um processo de envelhecimento da população e um aumento na procura por reabilitação com implantes. (20) Além disso, a maior parte destes pacientes apresenta algum tipo de desordem sistêmica como hipertensão e osteoporose. (43) Dessa forma, se faz necessário investigar o comportamento ósseo peri-implantar em animais hipertensos ovariectomizados, uma vez que esse modelo mimetiza uma situação clínica desafiadora para a reabilitação com implantes osseointegrados. Vale destacar, que apesar de ser uma situação clínica constante, há poucos estudos. Dessa forma, o ineditismo em utilizar sistemicamente o losartan e localmente o alendronato, pode repercutir em uma estratégia terapêutica a ser adotada nessas condições. Esses fármacos podem reverter o metabolismo ósseo comprometido pela hipertensão e pela deficiência de estrógeno, no intuito de se obter um tecido ósseo favorável para a osseointegração.

2 METODOLOGIA

Inicialmente o projeto foi enviado para Comitê de Ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP e obteve parecer favorável (FOA nº 00332-2018). Sendo assim, para esse estudo foram utilizadas 64 ratas espontaneamente hipertensas (SHR), adultas com 6 meses, com peso ao redor de 300 gramas. Os animais foram divididos em dois grupos conforme análises: Biomecânica e tecidos calcificados (Tabela 2). Nestes grupos, conforme a cirurgia de indução da osteoporose e se submetidos à instalação de implantes com superfície tratada com alendronato de sódio (ALE), os animais foram divididos de forma randômica em quatro subgrupos: SHR SHAM, SHR SHAM ALE, SHR OVX e SHR OVX ALE (Tabela 3). Logo após, em cada animal foi realizada a cirurgia para instalação de um implante em uma tíbia. Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração e alimentados com ração balanceada (1.4% Ca e 0.8%-Pe Nuvilab, Curitiba PR, Brazil) e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

TABELA 1 - Divisão dos grupos de análises e distribuição das tíbias (n) por grupo

Grupos de análises		SHR	SHR	SHR	SHR
		SHAM	SHAM	OVX	OVX
			ALE		ALE
Biomecânica	Torque Reverso	8	8	8	8
Tecidos	Micro-CT	8	8	8	8
Calcificados	Epifluorescência				
Total (n)	64 tíbias	16	16	16	16
	64 animais				

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

TABELA 2 - Divisão dos subgrupos, conforme cirurgia e tratamento submetidos

Subgrupos	Cirurgias	Tratamento
SHR SHAM	Cirurgia fictícia de exposição dos ovários Instalação de 1 implante em uma tíbia	Losartan 30mg/kg/dia
SHR SHAM ALE	Cirurgia fictícia de exposição dos ovários Instalação de 1 implante em uma tíbia	Losartan 30mg/kg/dia Superfície de alendronato
SHR OVX	Ovariectomia bilateral Instalação de 1 implante em uma tíbia	Losartan 30mg/kg/dia
SHR OVX ALE	Ovariectomia bilateral Instalação de 1 implante em uma tíbia	Losartan 30mg/kg/dia Superfície de alendronato

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

2.1 Ciclo estral e cirurgia de ovariectomia

Previamente a cirurgia de ovariectomia, foi conferido se as ratas hipertensas estavam ciclando normalmente. Diariamente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e 1-2 gotas de soro fisiológico foram introduzidas no interior da vagina, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata de reconhecimento das fases do ciclo estral, pela técnica de Long & Evans. (44) As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares. A remoção cirúrgica dos dois ovários foi realizada sob anestesia com 100 mg/kg de Cetamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 5 mg/kg de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal.

2.2 Tratamento sistêmico com Losartan

Em todos os grupos, o controle da pressão arterial foi realizado por meio da administração de losartan (Biosintética, São Paulo, Brazil) via oral em concentrações de 30 mg/kg/dia após a diluição em 50 mL de água. Este volume de líquido foi oferecido para cada animal diariamente, começando 30 dias após a ovariectomia e 7 dias antes da cirurgia de instalação dos implantes, estendendo até o dia da eutanásia. A cada 7 dias, os animais foram pesados e a dose foi ajustado de acordo com o peso. Todos os dias, os frascos foram verificados para assegurar que toda medicação foi tomada, conforme estudo anterior. (17)

2.3 Monitorização da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi verificada no pré-operatório e durante todos os dias antes da eutanásia por pletismografia indireta tail-cuff, usando um Physiograph®, MK-III-S (Narco Bio-sistemas, Houston, Texas, EUA), adaptado para medições em ratos, seguindo trabalhos anteriores. (17,45)

2.4 Tratamento dos implantes com Alendronato

Os implantes foram preparados no Laboratório da Faculdade de Ciências de Bauru/Unesp a partir da técnica layer by layer, na qual acrescenta camadas de revestimento de polieletrólitos via interação eletrostática. (46) Para uma monocamada de alendronato de revestimento na superfície dos implantes, como precursora se teve a imersão dos implantes em uma camada de poliestireno sulfato de sódio (PSS). Depois os implantes foram imersos em uma camada de dióxido de titânio (TiO₂), e por último os implantes foram revestidos de uma camada de alendronato de sódio em uma concentração de 1 grama por meio de atração eletrostática.

Os ingredientes das suspensões foram misturados em quantidades apropriadas em recipientes de vidro refrigerados a água, utilizando uma sonda de

sonicador (modelo XLS-2015, Misonix, Inc., New York, NY), então os implantes foram mergulhados na camada de revestimento desta solução. (46)

Figura 1 – Tratamento dos implantes com alendronato de sódio



Soluções de revestimento da superfície dos implantes pela técnica de layer by layer por meio de poliestireno de sódio, dióxido de titânio e 1 grama de alendronato de sódio. Implantes de 2 x 4 mm mergulhados para revestimento da superfície do implante com alendronato de sódio.

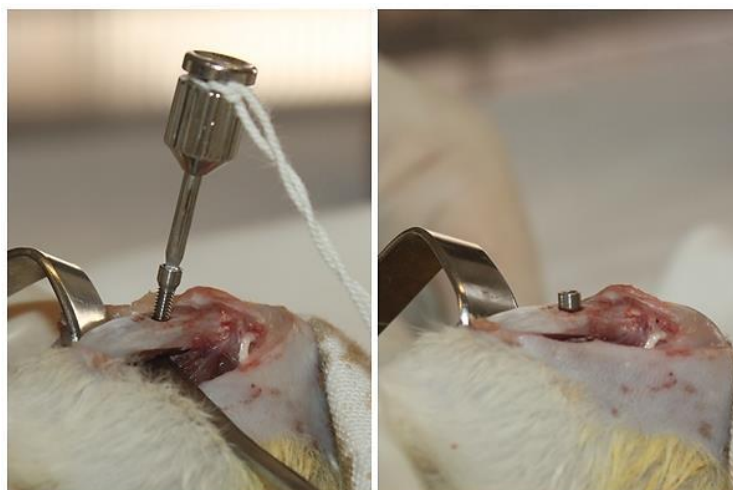
Fonte: Arquivos do laboratório

2.5 Cirurgia de instalação dos implantes

Para a cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias, os animais foram submetidos a jejum pré-operatório de 8 horas para serem anestesiados com uma combinação de 100 mg/kg de Cetamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 5 mg/kg de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda–Osasco, São Paulo, Brasil). Também foi administrado cloridrato de Mepivacaína (0,3 ml/kg 2% Scandicaine, Adrenalina 1: 100.000; Septodont, Saint- Maur-des-Fosse's, França) para anestesia e hemostasia local. Após anestesia, o local cirúrgico na porção medial tíbia foi feito tricotomia, e submetido à desinfecção tópica com Iodo degermante (10% PVPI, Riodeine degermante; Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Foi realizada uma incisão de 1,5 cm, seguida pela divulsão para a exposição da metáfise tibial. Foi

instalado um implante de titânio grau 4 tratados com óxido de alumínio e ácido nítrico (HNO₃) (Mendes, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) nos grupos SHR SHAM e SHR OVX, com dimensões de 2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento. Os grupos SHR SHAM ALE e SHR OVX ALE receberam os mesmos implantes com alendronato de sódio incorporado em suas superfícies. Com a fresa de 1.6 milímetros de diâmetro acoplado ao motor elétrico (BLM 600, Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 RPM sob irrigação isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico, Laboratórios Biosintética Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi confeccionado o defeito cirúrgico para a posterior instalação manual do implante com chave digital hexagonal. A ferida foi suturada por planos, sendo a camada profunda com fio absorvível (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) e a camada externa, com monofilamento (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). No período pós-operatório imediato, os animais receberam uma única injeção de pentabiótico intramuscular (0,1 mg/kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e dipirona sódica (1 mg/kg/1 dia-1, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil). (Figura 2)

FIGURA 2 – Sequência de instalação dos implantes



Acesso a metáfise tibial e instalação com chave manual do implante de 2 x 4 mm.
Fonte: Arquivos do laboratório

2.6 Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 60 dias após a instalação dos implantes (dia 97) por meio de dose letal de anestésico (150 mg/kg; Tiopental Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil).

2.7 Grupo de análise Biomecânica

2.7.1 Torque reverso

Para a análise biomecânica, foram utilizadas as tíbias de oito animais por subgrupo para aferir a quantidade de força relativa aplicada para a remoção do implante. Assim, estes foram anestesiados por uma combinação de 50 mg/kg de Cetamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 5 mg/kg de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) tiveram as metáfises das tíbias reabertas para realização do torque reverso. Um monta-implante (Conexão, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante (Figura 2 A-B). 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) (Figura 2 C-D). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística.

FIGURA 3 - Torque reverso

A: Torquímetro digital utilizado; **B:** Exposição do implante **C:** Realização do torque reverso; **D:** Registro do valor de torque reverso.
 Fonte: Arquivos do laboratório

2.8 Grupo de análises dos Tecidos Calcificados

2.8.1 Micro-CT

As tíbias de oito ratos por subgrupo foram removidas após a eutanásia, fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, banhadas em água corrente por 24 horas, armazenadas em álcool 70% para serem transportadas até serem escaneadas. Para o scanearmento foi utilizado o microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) com cortes de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. A sequência de imagens obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente no software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) foi padronizado o posicionamento de todas amostras nos planos transversal, longitudinal e sagital. Em seguida, no software CTAnalyser (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a região de análise ao redor do implante no plano transversal.

Foram demarcadas a uma distância de 50 slices em direção proximal e 50 slices em direção distal, em relação ao osso no qual o implante foi instalado. Assim, totalizando um volume com 100 slices (874,3 μm). O software CTAnalyser calculou o valor morfométrico baseado em escala de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise será de 25-90 tons de cinza, para delimitar o osso formado ao redor dos implantes. A partir dessa conversão o software realizou o cálculo morfométrico aplicado ao implante em sentido transversal e forneceu os parâmetros de porcentagem de volume ósseo (BV/TV), quantidade óssea de contato entre osso e implante (BIC), espessura do trabeculado (Tb.Th), número de trabéculas (Tb. N) e porosidade total (Po.Tot). Os parâmetros adotados seguirem o guia fornecido pela American Society of Bone and Mineral Research (47) e de análises realizadas em estudos prévios. (48,49) A Reconstrução microtomográfica de cada uma das amostras foi feita pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

FIGURA 4 - Reconstrução microtomográfica

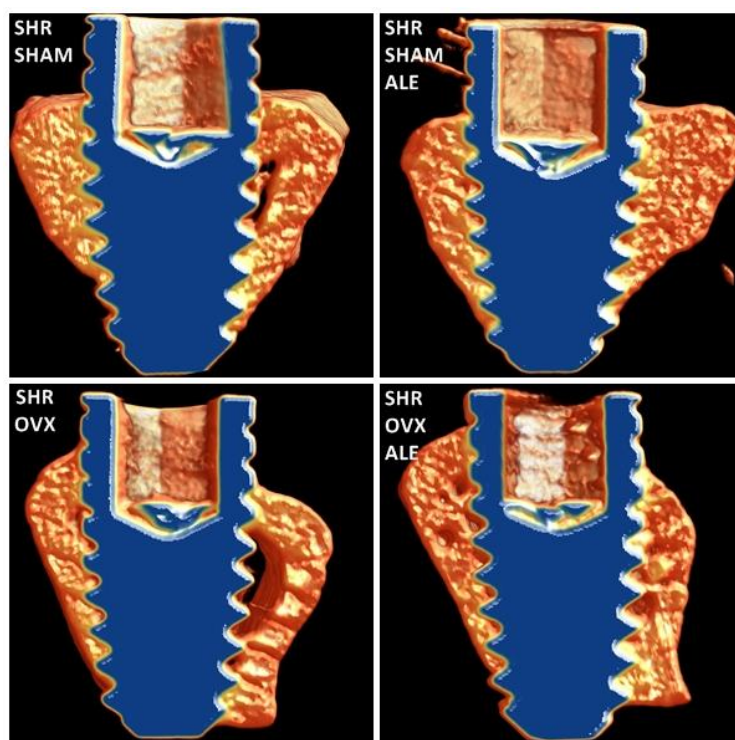


Imagem tridimensional representativa de cada um dos grupos pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

2.8.2 Microscopia por epifluorescência

Após a fixação em formalina tamponada a 10%, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente para serem incluídas em resina e analisadas pelos fluorocromos de Calceína e Alizarina para mensuração de osso “antigo” e osso “novo” respectivamente. Nessa análise foi avaliada a precipitação e biomarcação de fluorocromos que foram injetados previamente em doses de 20mg/kg por animal. Os fluorocromos de calceína foram injetados 14 dias após a instalação dos implantes (Dia 51), já os fluorocromos de vermelho de alizarina aos 42 dias após os implantes (Dia 79). Com as lâminas preparadas pelo Sistema Exakt foi possível capturar as imagens do osso peri-implantar pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (Figura 6, original, 100x). As imagens escaneadas foram analisadas com o software Image J (Software Analisador de Imagens, Ontario, Canadá), por meio da ferramenta freehands, sendo possível determinar a dinâmica de neoformação óssea durante 14 e 42 dias por meio da sobreposição dos fluorocromos. As análises foram realizadas em duplo cego.

FIGURA 5 - Epiflorescência do osso peri-implantar com os fluorocromos de Calceína e Alizarina

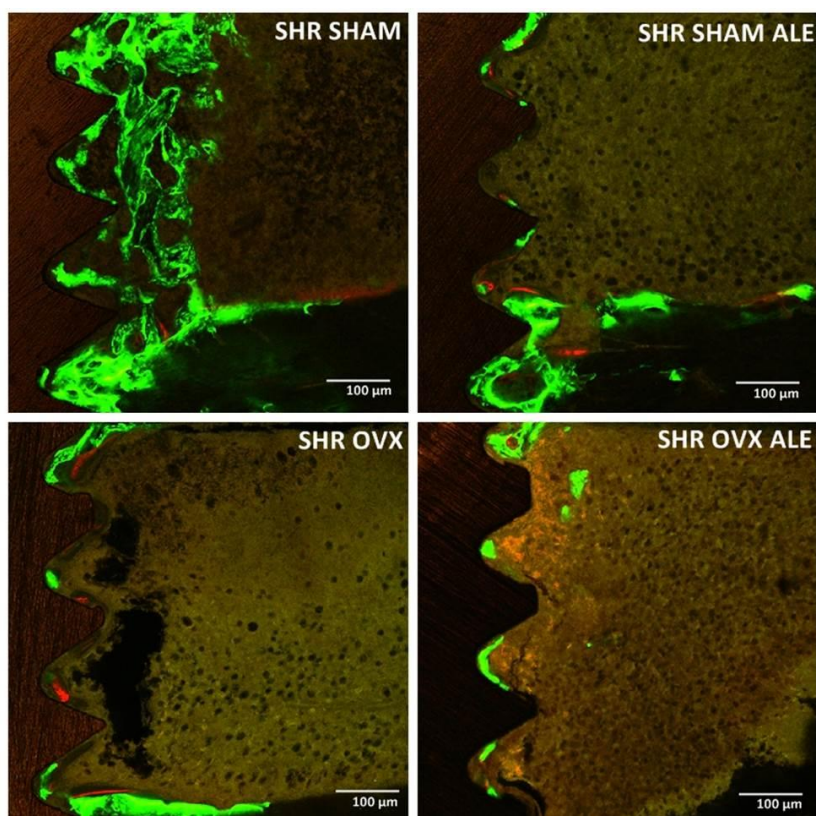


Imagem representativa de cada grupo SHR OVX, SHR OVX ALE, SHR SHAM, SHR SHAM. O osso antigo é marcado pela primeira aplicação do fluorocromo de calceína destacado em verde aos 14 dias e a alizarina em vermelho aos 42 dias após a instalação dos implantes.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

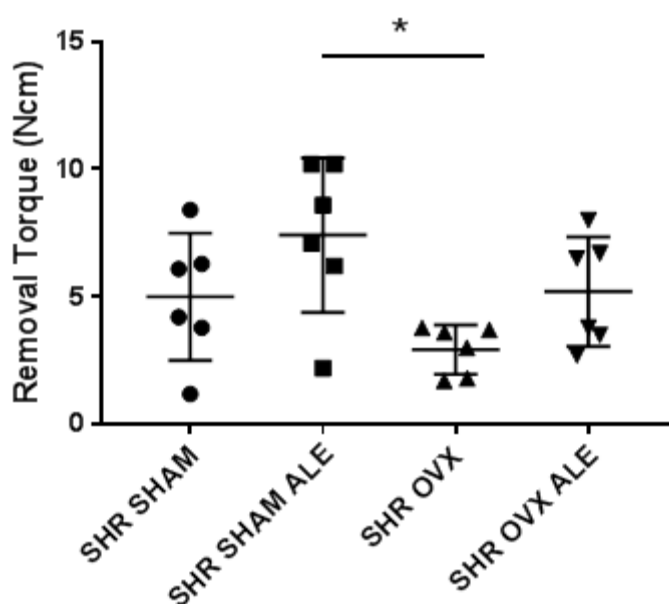
3 RESULTADOS

3.1 Grupo Biomecânica

3.1.1 Torque reverso

Sessenta dias após a instalação dos implantes foi mensurada o torque reverso para os grupos experimentais: SHR SHAM, SHR SHAM ALE, SHR OVX e SHR OVX ALE. Torque reverso aumenta até o implante girar dentro do osso, onde o valor de Newton por centímetro foi registrado. Na avaliação dos valores de torque reverso em N.cm, o grupo SHR SHAM ALE obteve uma média de 8 N.cm, no grupo SHR SHAM a média foi de 5 N.cm, e grupo SHR OVX ALE com 5.2 N.cm, já os grupo SHR OVX com 3.33 N.cm obtiveram os menores valores. Tendo esses dados, primeiro foi realizado o teste de homocedasticidade (Shapiro-Wilk), considerando ($P < 0,05$). Assim foi aplicado o teste ANOVA 1 fator (torque reverso). Como pós-teste, foi aplicado o teste Tukey. Foi observada diferença estatística entre os grupos SHR SHAM ALE e SHR OVX ($p = 0,024$).

GRÁFICO 1 - Torque reverso



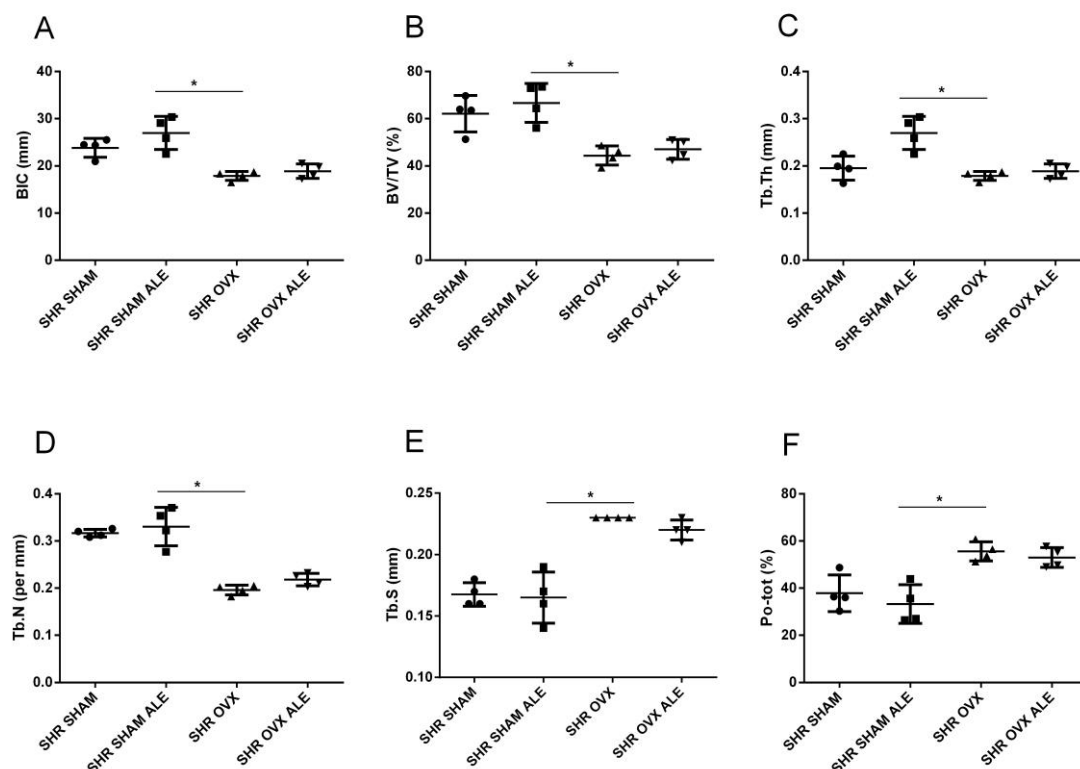
Valores médios do torque de remoção (Ncm) nos 4 grupos experimentais. O * indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

3.2 Grupo Tecidos Calcificados

3.2.1 Micro-CT

Na avaliação microtomográfica, referente à quantidade de osso em contato com o implante (BIC), o grupo SHR SHAM ALE foi obtida média de 25.527 mm³, no SHR SHAM de 22.259 mm³, SHR OVX de 18.4597 mm³ e SHR OVX ALE com 19.128 mm³. Com diferença entre os grupos SHR SHAM ALE e SHR OVX ($p < 0,05$, Holm-Sidak). Quando avaliado a porcentagem de volume óssea (BV/TV) o grupo SHR OVX (43%) se mostrou inferior ao grupo SHAM OVX ALE (48,55%). SHR SHAM (62,75%), e o maior valor foi do grupo SHR SHAM ALE (69,02%), com diferença estatística comparado com SHR OVX ($p < 0,05$, Holm-Sidak). Referente as trabéculas ósseas peri-implantares, a espessura trabecular (Tb.Th) foi maior no SHR OVX (0.23 mm), com resultados semelhantes entre os SHR SHAM (0.19 mm) e SHR SHAM ALE (0.20 mm), os quais apresentaram resultados superiores em comparação ao SHR OVX ALE (0.22 mm), com diferença estatística entre SHR SHAM ALE e SHR OVX ($p < 0,05$, Holm-Sidak). Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido uma média de 3,64 mm para SHR SHAM ALE tendo valor próximo ao SHR SHAM, já os menores números para o grupo SHR OVX com 2 mm e SHR OVX ALE com 2.2 mm. Diferença entre SHR SHAM ALE e SHR OVX ($p < 0,05$, Holm-Sidak). A menor separação entre as trabéculas foram nos animais SHR SHAM ALE com espaço de 0.16mm, seguida dos SHR SHAM com 0.17mm, e as mais espaçadas SHR OVX ALE 0.22mm e SHR OVX com 0.23mm. Em relação à porosidade da área avaliada através da porcentagem de porosidade total (Po(tot)), os valores foram 57% (SHR OVX), 52% (SHR OVX ALE), 31% (SHR SHAM ALE) e SHR SHAM com 38%, com diferença estatística entre SHR OVX e SHR SHAM ALE ($p < 0,05$, Holm-Sidak).

GRÁFICO 2 - Microtomografia computadorizada do osso peri-implantar

As tíbias foram fixadas em formaldeído e logo depois scanneadas no sentido longitudinal. O * indica diferença estatística ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

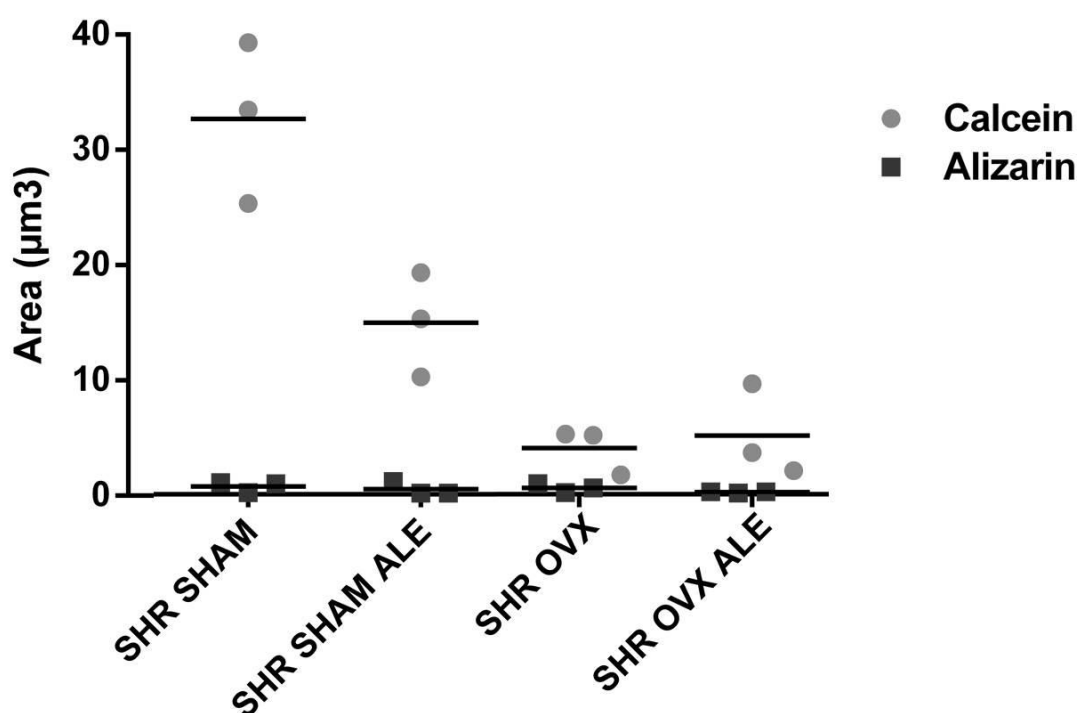
3.3 Análise de epifluorescência

Na análise de epifluorescência é possível mensurar quantidade de precipitação de cálcio ocorrida no momento da injeção do fluorocromo. O gráfico abaixo mostra a precipitação no momento da injeção da calceína, primeiro fluorocromo a ser injetado, e, portanto, representativo do osso antigo (Figura 6). No estudo deste parâmetro, a presença de calceína está relacionada à maior preservação do osso antigo, ou seja, uma menor atividade de reabsorção osteoclástica. Além do fluorocromo de alizarina, representativo do osso novo.

Observou-se que nas ratas ovariectomizadas e hipertensas, a presença do alendronato local não interferiu na dinâmica óssea, permitindo que a atividade osteoclástica acontecesse. Isso resultou na diminuição da precipitação de calceína, em níveis semelhantes nos animais ovariectomizados. Nas ratas SHAM SHR,

observa-se que a atividade de reabsorção mostrou-se menor, como uma resposta ao losartan ($31\mu\text{m}^3$, Figura 6). Assim, preveniu-se a reabsorção óssea e atividade osteoclástica, aumentada durante a hipertensão. Quando as ratas hipertensas receberam a associação do losartan sistêmico e alendronato local, foi possível observar que este reduziu o efeito do losartan sistêmico, um aumento da atividade osteoclástica ($16\mu\text{m}^3$, Figura 6). Estes resultados mostram que o alendronato local modula a resposta do losartan quando diminui a atividade osteoclástica durante o reparo peri-implantar. O resultado mostrou o efeito do alendronato local sobre a superfície do implante e do losartan sistêmico no osseo reparacional. Houve maior taxa de deposição de cálcio nos animais SHR SHAM, e os menores valores para os animais submetidos à cirurgia de ovariectomia SHR OVX ($4\mu\text{m}^3$, Figura 6), com discreta melhora quando as superfícies dos implantes são tratadas com alendronato nos animais SHR OVX ALE ($6\mu\text{m}^3$, Figura 6).

GRÁFICO 3 - Análise de epifluorescência do osso peri-implantar

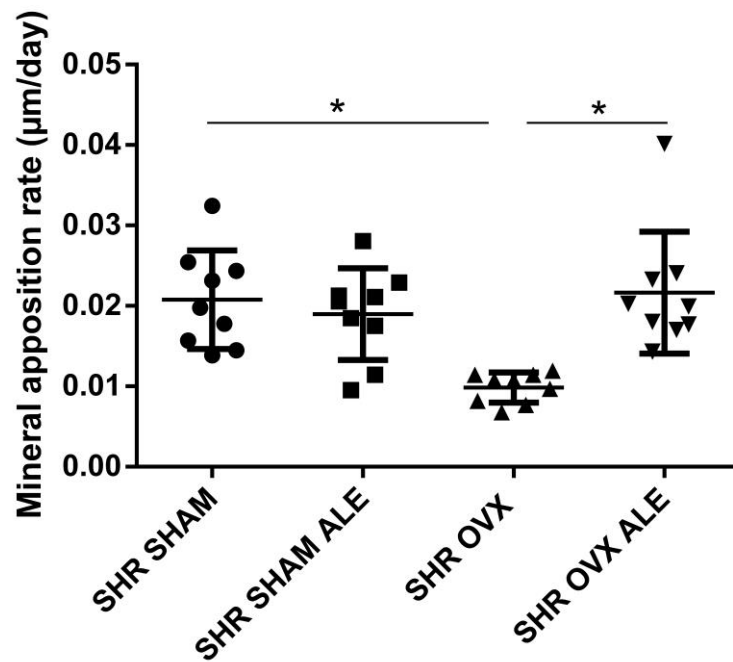


Quantificação da área de precipitação do fluorocromo de calceína, 14 dias após a instalação dos implantes. Sem diferença estatística entre os grupos ($p>0.05$).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

A taxa de aposição mineral diária mostrou um equilíbrio entre todos os grupos avaliados. A ação sinérgica de losartan sistêmico e alendronato local contribuiu para que a precipitação de cálcio diária sobre o osso peri-implantar ocorresse de forma semelhante em todas as condições sistêmicas. Vale destacar uma discreta redução desta taxa nas ratas hipertensas e ovariectomizadas.

GRÁFICO 4 - Aposição óssea mineral



Esses valores são de precipitação óssea diária. Os valores são calculados pela distância entre os dois fluorocromos e dividido pelos 28 dias de diferença entre eles.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

4 DISCUSSÃO

A hipertensão quando não tratada leva um atraso no reparo ósseo alveolar, (50) porém anti-hipertensivos são capazes de melhorar o reparo (51) e o metabolismo ósseo. (52) Além da hipertensão, a osteoporose também gera um reparo ósseo inadequado, (49) mas o uso de antirreabsortivos locais como alendronato de sódio favorece a osseointegração. (30) Sendo assim, considerando os benefícios dos anti-hipertensivos e dos antirreabsortivos, surgiu a hipótese do uso benéfico dessas drogas sobre as condições de hipertensão e osteoporose. Corroborando com esse trabalho, estudo recente mostra maior taxa de aposição óssea alveolar em animais tratados com losartan, droga anti-hipertensiva. (53) Também em suporte com essa hipótese, os resultados obtidos mostram maior força de torque reverso e melhores parâmetros ósseos microtomográficos em animais hipertensos tratados com losartan e que receberam os implantes funcionalizados com alendronato de sódio.

Em condições de hipertensão e deficiência de estrógeno, a associação entre losartan sistêmico e alendronato de sódio local não foi capaz de reverter essa condição prejudicada, possivelmente a alta atividade osteoclástica provocadas pelo modelo de hipertensão (45) e deficiência de estrógeno. (54) O sinergismo dessas duas drogas funcionou na presença exclusiva da hipertensão, onde foram observados os maiores valores de torque reverso. A hipertensão leva um aumento da expressão de RANKL e redução de RUNX2, com consequente desequilíbrio no metabolismo ósseo. A osteoporose também atua aumentando RANKL e número de osteoclastos. (55) Sendo assim, as duas condições diminuem a deposição de cálcio, como mostrou os resultados de epipluorescência. Na análise dos fluorocromos, o uso das duas drogas não foi capaz de melhorar a precipitação de cálcio em animais hipertensos e ovariectomizados, onde os menores valores ficaram com os grupos SHR OVX e SHR OVX ALE.

Os menores valores de cálcio, referentes à dinâmica dos fluorocromos, observada no tecido ósseo de animais hipertensos e ovariectomizados podem ser justificados pela alteração do metabolismo de cálcio. O aumento de citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina-6 (IL-6), (TNF- α) estão associadas ao surgimento de doenças cardiovasculares na hipertensão e osteoporose. (56) A arteriosclerose

ou calcificação vascular presente em condições de hipertensão e osteoporose ocorre pela diferenciação de células vasculares em osteoblasto e osteoclasto-like. (57) Trabalho recente também mostra que o fluxo sanguíneo interfere diretamente na osteogênese. (58) O aporte sanguíneo inadequado pela hipertensão (59) ou osteoporose (58) pode afetar significativamente a formação óssea. O mesmo trabalho ainda mostra o efeito positivo no metabolismo ósseo de camundongos idosos após administração de alendronato. (58) O alendronato levou a maior expressão de células osteoprogenitoras endoteliais do tipo H, osterix e melhora do fluxo sanguíneo. Com isso, o possível efeito das duas alterações sistêmicas no fluxo sanguíneo pode não ter sido revertido com o uso do losartan e do alendronato no modelo deste estudo.

Estudos prévios relatam uma osseointegração inadequada em animais espontaneamente hipertensos, onde o losartan mostrou-se eficiente para reverter essa condição. (60) Da mesma forma, os dados obtidos também sugerem uma melhora do reparo ósseo peri-implantar nos animais hipertensos tratados com losartan e implantes tratados com alendronato. Porém, não foi eficiente quando a condição sistêmica de osteoporose foi adicionada ao modelo experimental, onde não pode ser compensado de mesma forma. Dessa maneira, os resultados também podem ser extrapolados parcialmente para o ponto de vista clínico. Por isso, sugerem-se pesquisas para investigar um possível risco de implantes em pacientes hipertensas na menopausa. Os achados também sugerem o não sinergismo do losartan e alendronato, talvez as concentrações possam ser ajustadas para um próximo estudo, a fim de que novas respostas celulares sejam avaliadas neste modelo experimental. Sendo assim, se faz necessário novos estudos na busca de inovações terapêuticas para a melhora do reparo ósseo na presença das duas alterações sistêmicas. Ainda se faz necessário verificar se o efeito positivo do losartan e do alendronato ocorre por meio da melhora do fluxo sanguíneo ou por meio da diferenciação de células ósseas.

5 CONCLUSÃO

Como conclusão, a evidência deste trabalho sugere que o uso do losartan sistêmico e alendronato de sódio local melhoram o reparo ósseo peri-implantar na hipertensão, mas não associada a deficiência de estrógeno. Adicionalmente, a presença de hipertensão e deficiência de estrógeno pode ser um fator de risco a implantodontia.

REFERÊNCIAS

1. Warburton DE, Nicol CW, Gatto SN, Bredin SS. Cardiovascular disease and osteoporosis: Balancing risk management. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):673–89.
2. Varenna M, Manara M, Galli L, Binelli L, Zucchi F, Sinigaglia L. The association between osteoporosis and hypertension: the role of a low dairy intake. *Calcif Tissue Int.* 2013;93(1):86–92.
3. Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol.* 1982;243(3):H365-70.
4. Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(11):898-907.
5. McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1981;3(3 Pt 2):1162-7.
6. Musini VM, Gueyffier F, Puil L, Salzwedel DM, Wright JM. Pharmacotherapy for hypertension in adults aged 18 to 59 years. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;8:CD008276.
7. Moura AP, Montalvany-Antonucci CC, Rodrigues de Albuquerque Taddei S, Queiroz-Junior CM, Bigueti CC, Garlet GP, et al. Effects of angiotensin II type I receptor blocker losartan on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2016;149(3):358–65.
8. Santos CF, Morandini AC, Dionisio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134601.
9. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sanchez MP, Okamoto T, Okamoto R, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015;19(6):1319–27.

10. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *Faseb J*. 2008;22(7):2465–75.
11. Santos CF, Morandini AC, Dionisio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134601.
12. Kuipers AL, Kammerer CM, Pratt JH, Bunker CH, Wheeler VW, Patrick AL, et al. Association of circulating renin and aldosterone with osteocalcin and bone mineral density in african ancestry families. *Hypertension*. 2016;67(5):977-82.
13. Al-Majed AR, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartan: Comprehensive Profile. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2015;40:159-94.
14. Rajkumar DS, Faitelson AV, Gudyrev OS, Dubrovin GM, Pokrovski MV, Ivanov AV. Comparative evaluation of enalapril and losartan in pharmacological correction of experimental osteoporosis and fractures of its background. *J Osteoporos*. 2013;2013:325693.
15. Bastos MF, Brilhante FV, Goncalves TE, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol*. 2010;81(7):1075–83.
16. Yamamoto S, Kido R, Onishi Y, Fukuma S, Akizawa T, Fukagawa M, et al. Use of renin-angiotensin system inhibitors is associated with reduction of fracture risk in hemodialysis patients. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122691.
17. Gealh WC, Pereira CC, Luvizuto ER, Garcia-Junior IR, Antoniali C, Okamoto R. Healing process of autogenous bone graft in spontaneously hypertensive rats treated with losartan: an immunohistochemical and histomorphometric study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(12):2569–81.
18. Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med*. 2006;260(4):350–62.

19. Wu X, Al-Abedalla K, Eimar H, Arekunnath Madathil S, Abi-Nader S, Daniel NG, et al. Antihypertensive medications and the survival rate of osseointegrated dental implants: a cohort study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(6):1171-82.
20. Lee HJ, Kim YK, Park JY, Kim SG, Kim MJ, Yun PY. Short-term clinical retrospective study of implants in geriatric patients older than 70 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(4):442–6.
21. Nickenig G, Bäumer AT, Grohè C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. 1998;97(22):2197–201.
22. See S. Angiotensin II receptor blockers for the treatment of hypertension. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(11):1795–804.
23. Nickenig G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Schölkens BA, et al. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt 2):H2701-7.
24. Donmez BO, Ozdemir S, Sarikanat M, Yaras N, Koc P, Demir N, et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs. *Pharmacol Rep*. 2012;64(4):878–88.
25. Mulinari-Santos G, de Souza Batista FR, Kirchweiger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(11):1126-34.
26. Mulinari-Santos G, Santos JSD, Palin LP, Silva ACE, Antoniali C, Faverani LP, et al. Losartan improves alveolar bone dynamics in normotensive rats but not in hypertensive rats. *J Appl Oral Sci Rev*. 2019;27:e20180574.
27. Dionísio TJ, Souza GP, Colombini-Ishikiriama BL, Garbieri TF, Parisi VA, Oliveira GM, et al. AT1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, block inflammatory mediators, upregulate antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol*. 2020;91(4):533-44.

28. Jeal W, Barradell LB, McTavish D. Alendronate. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in postmenopausal osteoporosis. *Drugs*. 1997;53(3):415–34.
29. Tanaka S, Yamamoto T, Oda E, Nakamura M, Fujiwara S. Real-world evidence of raloxifene versus alendronate in preventing non-vertebral fractures in Japanese women with osteoporosis: retrospective analysis of a hospital claims database. *J Bone Miner Metab*. 2018;36(1):87-94.
30. Kim JH, Park YB, Li Z, Shim JS, Moon HS, Jung HS, et al. Effect of alendronate on healing of extraction sockets and healing around implants. *Oral Dis*. 2011;17(7):705–11.
31. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032–45.
32. Kellesarian SV, Abduljabbar T, Vohra F, Malignaggi VR, Malmstrom H, Romanos GE, et al. Role of local alendronate delivery on the osseointegration of implants: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(7):912–21.
33. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(7):632–8.
34. Paiva-Fonseca F, Santos-Silva A-R, Della-Coletta R, Vargas P-A, Lopes M-A. Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: a review of the main topics. *Med Oral Patol Oral Cirurgia Bucal*. 2014;19(2):e106-111.
35. Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Søballe K. Local alendronate increases fixation of implants inserted with bone compaction: 12-week canine study. *J Orthop Res*. 2007;25(4):432–41.
36. Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Søballe K. Effect of topical alendronate treatment on fixation of implants inserted with bone compaction. *Clin Orthop*. 2006;444:229–34.

37. Vohra F, Al-Rifaiy MQ, Almas K, Javed F. Efficacy of systemic bisphosphonate delivery on osseointegration of implants under osteoporotic conditions: lessons from animal studies. *Arch Oral Biol.* 2014;59(9):912–20.
38. Dutra BC, Oliveira AMSD, Oliveira PAD, Manzi FR, Cortelli SC, Cota LOM, et al. Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. *J Appl Oral Sci Rev* 2017;25(3):310–7.
39. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(1):11–8.
40. Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee WS. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec.* 1997;249(2):173–80.
41. Lund-Johansen P, Omvik P. Acute and chronic hemodynamic effects of drugs with different actions on adrenergic receptors: a comparison between alpha blockers and different types of beta blockers with and without vasodilating effect. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991;5(3):605–15.
42. Kim HS, Lee JI, Yang SS, Kim BS, Kim BC, Lee J. The effect of alendronate soaking and ultraviolet treatment on bone-implant interface. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(9):1164–72.
43. Busenlechner D, Furhauser R, Haas R, Watzek G, Mailath G, Pommer B. Long-term implant success at the Academy for Oral Implantology: 8-year follow-up and risk factor analysis. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44(3):102–8.
44. Long JA, Evans HML. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. Berkeley: University of California Press; 1922.
45. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sanchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015;19(6):1319–27.

46. Shi Q, Qian Z, Liu D, Liu H. Surface modification of dental titanium implant by layer-by-layer electrostatic self-assembly. *Front Physiol.* 2017;8:574.
47. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Min Res.* 2013;28(1):2–17.
48. Faverani LP, Polo TO, Ramalho-Ferreira G, Momesso GA, Hassumi JS, Rossi AC, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):255-65.
49. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(6):798–805.
50. Manrique N, Pereira CC, Garcia LM, Micaroni S, Carvalho AA, Perri SH, et al. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):222–7.
51. Yamamoto S, Kido R, Onishi Y, Fukuma S, Akizawa T, Fukagawa M, et al. Use of renin-angiotensin system inhibitors is associated with reduction of fracture risk in hemodialysis patients. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122691.
52. Zhang S, Li H, Tang H, Huo S, Nie B, Qu X, et al. Felodipine blocks osteoclast differentiation and ameliorates estrogen-dependent bone loss in mice by modulating p38 signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2020;387(2):111800.
53. Mulinari-Santos G, Santos JSD, Palin LP, Silva ACE, Antoniali C, Faverani LP, et al. Losartan improves alveolar bone dynamics in normotensive rats but not in hypertensive rats. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180574.
54. Gruber R. Molecular and cellular basis of bone resorption. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165:48–53.
55. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504–8.

56. Mantovani A, Sozzani S, Introna M. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;832:93–116.
57. Warburton DE, Nicol CW, Gatto SN, Bredin SS. Cardiovascular disease and osteoporosis: Balancing risk management. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):673–89.
58. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M, Zeuschner D, Bixel MG, Milia C, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *Nat Commun.* 2016;7:13601.
59. Rizzoni D, Pasini E, Flati V, Rodella LF, Paiardi S, Assanelli D, et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin signaling and prevent microvascular rarefaction in the skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2008;26(8):1595–601.
60. Mulinari-Santos G, de Souza Batista FR, Kirchweger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(11):1126–34.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



FLS. 323/18
 PROC. 323/18
 NUB. 18-0

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Caracterização do tecido ósseo peri-implantar em ratas hipertensas e com deficiência de estrógeno, após ação sinérgica de Losartan e Alendronato de Sódio"**, Processo FOA nº 00332-2018, 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 08 de Junho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 25 de Maio de 2021.

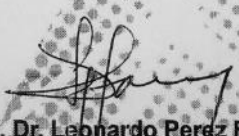
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 25 de Junho de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Characterization of peri-implant bone tissue in hypertensive and estrogen-deficient rats after the synergistic action of Losartan and Alendronate Sodium"**, Protocol FOA nº 00332-2018, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 08, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 25, 2021

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 25, 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