

Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

**Análise do reparo ósseo da superfície de implante
revestida com raloxifeno através das análises
topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e
imunoistoquímica**

**Araçatuba – SP
2021**

Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

**Análise do reparo ósseo da superfície de implante
revestida com raloxifeno através das análises
topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e
imunoistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Odontologia (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Junior

Araçatuba – SP
2021

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

R375a Reis, Erik Neiva Ribeiro de Carvalho.
Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida
com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica,
histológica, histométrica e imunoistoquímica / Erik Neiva
Ribeiro de Carvalho Reis. - Araçatuba, 2021
62 f.; 22 il.; 4 tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Implantes dentários 2. Cloridrato de raloxifeno 3. Titânio
I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA



Eu dedico esta conquista ao meu porto seguro: **a minha família.**

Ao meu pai (Aroldo de Carvalho Reis), meu amigo, meu primeiro professor e meu maior incentivador nessa caminhada. O senhor me educou não só academicamente, mas me ensinou os valores de uma vida digna e honesta. Agradeço a Deus todos os dias, por ter me dado à chance de ter um pai como o senhor! Sou seu fã e tenho muito orgulho de ser seu filho! Eu te amo e te amarei por toda a minha vida!

À minha mãe (**Rosiane de Neiva Ribeiro**), por me amar de uma forma incondicional, sempre tentando proporcionar o meu melhor. Um exemplo de mãe , professora, mulher e esposa. A senhora é meu porto seguro e maior exemplo de amor e zelo pela família. Sem seu amor e apoio, não conseguiria ter chegado até aqui. Te amo minha mãe.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Junior. Por ter me aceitado como seu orientado. Seus ensinamentos teóricos e clínicos, aliados à sua serenidade e humildade, o tornam um grande cirurgião e sobretudo um grande líder! Sou seu admirador! Muito obrigado por tudo!

A Prof. Dra. Ana Paula fernazi Bassi, pela confiança, carinho, disponibilidade em ensinar e ajudar nos projetos desenvolvidos nesse período da pós-graduação. Sou muito grato à senhora! Um grande exemplo de professora!

Ao Professor Dr. Francisley Ávila Souza, pelos ensinamentos, sempre de bom humor, pela sua disponibilidade em ajudar não só a mim, como a todos os alunos da pós-graduação. Muito obrigado!

À Professora Dra. Daniela Ponzoni, por estar sempre incentivando e ajudando nas diversas pesquisas desenvolvidas em nosso departamento. Admiro muito a senhora pela sua competência e serenidade. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. Oswaldo Magro Filho, pelos ensinamentos principalmente na área de cirurgia ortognática. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. Leonardo Perez Faverani, pela amizade e por ter me incentivado a ingressar nesta pós-graduação. Você abriu as portas desta casa para mim e hoje tenho muito orgulho de fazer parte dela. Sou muito grato pelos seus ensinamentos e por sua disponibilidade em ajudar sempre quando precisei. Muito obrigado!

À Professora Dra. Roberta Okamoto, por sua disponibilidade em ensinar e ajudar, principalmente nas análises laboratoriais. Sua ajuda é de extrema importância para o nosso departamento. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. André Fabris, por todas as oportunidades e a confiança depositada em mim, desde o início da minha pós graduação. Obrigado por tudo meu amigo!!

Ao Professor Dr. Albanir, por aceitar de prontidão o convite em fazer parte desse momento e contribuir com esse trabalho. Obrigado!

A minha esposa Bruna de Oliveira, Araçatuba me deu um presente e foi você! Obrigado por ser a minha parceira de todas as horas, pela paciência que a rotina da pós-graduação requer, por me incentivar e apoiar em todas as situações. Sem a sua ajuda e apoio, esse desafio teria sido bem mais difícil. Te amo!

Ao Leonardo de Freitas, um amigo que a pós-graduação me permitiu conhecer. Torço pelo seu sucesso sempre! Muito obrigado por tudo!

Aos amigos João Paulo Bonardi e Gustavo Momesso, pela amizade e parceria em diversos trabalhos. Contem sempre comigo!

Aos amigos Valthierre Nunes e Fábio Batista pela amizade e por boas conversas sobre cirurgia e a vida!

Ao meu amigo Pedro Henrique, pelos anos de amizade, desde a residência em Bauru, tornou-se um grande amigo ao longo desses anos. Obrigado por ter me incentivado a vim fazer parte deste programa de pós-graduação. Conte sempre comigo!

Ao meu amigo Ciro Duailibe pela amizade e parceria profissional iniciadas ainda no período de residência que perduram até os dias de hoje.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) -

Código de Financiamento 001 pela concessão da Bolsa de Doutorado durante 3 anos do curso.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de fazer parte do programa de pós-graduação desta instituição. Tenho muito orgulho de ser unespiano e ter a oportunidade de poder aprender e usufruir da estrutura física e dos docentes desta casa. Minha eterna gratidão e admiração!

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Prof. André Briso**, pela competência e maestria na condução da nossa pós-graduação.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade, paciência e compreensão nas etapas da pós graduação. Pelo trabalho árduo e sempre ágil.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Paulo Gratão, Marcos e Renato). Muito obrigado pela disponibilidade e respeito.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Aprendi muito com cada um de vocês. Obrigado pelos momentos descontraídos e alegres na vida diária da pós-graduação.

Aos pacientes, pela confiança depositada a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas. Minha gratidão.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Reis ENRC. Análise do reparo ósseo da superfície de implante revestida com raloxifeno através das análises topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2021.

RESUMO

Introdução: A fim de melhorar a osseointegração, pesquisas tem buscado tratamentos para superfícies de implantes. **Objetivo:** Avaliar resposta óssea na interface osso/implante, em modelo padronizado em tibia de rato, de superfícies de implantes de titânio comercialmente puro (Ti-cp) tratadas com raloxifeno (RLX). **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 144 implantes de Ti-cp, divididos em dois grupos (n=36) de acordo com o tratamento de superfície: 1-Controle (CRT); e 2-RLX. Após tratamentos, cada animal recebeu um implante em cada tibia. Os animais foram eutanaziados após 7, 15, 30 e 40 dias para análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. Dados quantitativos foram submetidos à ANOVA dois fatores e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** A análise histológica aos 7 dias do grupo RLX apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo comparada ao grupo CRT. Nos demais períodos, a modelação óssea foi semelhante. A análise histométrica, em relação à área óssea neoformada (AON), apresentou diferença significativa entre RLX e CRT após 7 ($p=0,005$) e 40 ($p=0,04$) dias. Em relação à análise de extensão linear de contato entre tecido ósseo e superfície do implante (ELCOI), houve diferença significativa entre RLX e CRT após 7 e 15 dias ($p=0,003$). Na análise imunoistoquímica aos 40 dias, RLX apresentou menos matriz óssea mineralizada e AON em relação ao CRT. **Conclusão:** Uso do RLX para modificação de superfície de implante demonstrou características de AON semelhantes ao CRT.

Palavras-chave: Implantes dentários. Raloxifeno. Titânio.

Reis ENRC. Analysis of bone repair of the implant surface coated with raloxifene through topographic, biomechanical, histological, histometric and immunohistochemical analyzes [thesis]. Araçatuba: São Paulo State University, School of Dentistry; 2021.

ABSTRACT

Background: To improve osseointegration, researches have sought implant surface treatments. **Purpose:** To evaluate bone response at bone/implant interface, in standardized rat tibia model, of commercially pure titanium (cp-Ti) implant treated with raloxifene (RLX). **Materials and Method:** 144 cp-Ti implants were divided into two groups (n=36) according to the surface treatment: 1-Control (CRT); and 2-RLX. After treatments, each animal received one implant in each tibia. The animals were euthanized after 7, 15, 30 and 40 days for histological, histometric and immunohistochemical analysis. Quantitative data were submitted to two-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha=0.05$). **Results:** Histological analysis at 7 days in RLX showed greater amount of connective tissue compared to CRT. In other timepoints, bone remodeling was similar. Histometric analysis, regarding the newly formed bone area (NBA), showed significant difference between RLX and CRT after 7 ($p=0.005$) and 40 ($p=0.04$) days. Regarding the analysis of linear extension of contact between bone tissue and implant surface (LECBI), there was significant difference between RLX and CRT after 7 and 15 days ($p=0.003$). In the immunohistochemical analysis at 40 days, RLX showed less mineralized bone matrix and NBA compared to CRT. **Conclusion:** Use of RLX to modify implant surface demonstrated NBA characteristics similar to CRT.

Keywords: Dental Implantation. Raloxifene. Titanium.

LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modificação por ácido grupo CRT	46
Figura 2	Preparação do Simulador de Fluido Corpóreo	46
Figura 3	Procedimento cirúrgico para a instalação dos implantes	47
Figura 4	Remoção do implante da peça incluída em parafina	48
Figura 5	Vista da área interface osso/implante para análise histológica	49
Figura 6	Histológico do período 7 dias do grupo CRT	49
Figura 7	Histológico do período 15 dias do grupo CRT	50
Figura 8	Histológico do período 30 dias do grupo CRT	50
Figura 9	Histológico do período 40 dias do grupo CRT	51
Figura 10	Histológico do período 7 dias do grupo RLX	51
Figura 11	Histológico do período 15 dias do grupo RLX	52
Figura 12	Histológico do período 30 dias do grupo RLX	52
Figura 13	Histológico do período 40 dias do grupo RLX	53
Figura 14	Padrão adotado: Imunomarcção Leve 2 setas; Imunomarcção Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcção Moderada 4 setas	53
Figura 15	Padrão adotado: Imunomarcção Leve 2 setas; Imunomarcção Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcção Moderada 4 setas	54
Figura 16	Padrão adotado: Imunomarcção Leve 2 setas; Imunomarcção Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcção Moderada 4 setas	55
Figura 17	Padrão adotado: Imunomarcção Leve 2 setas; Imunomarcção Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcção Moderada 4 setas	56
Figura 18	MEV do Grupo controle e grupo raloxifeno	57
Figura 19	EDR dos CRT (A) e RLX (B)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantificação das imunomarcações	41
Tabela 2 Resultados em porcentagem (AON)	41
Tabela 3 Resultados em porcentagem (ELCOI)	42
Tabela 4 Análise estatística da análise de torque-reverso para os GCRT e GRLX aos 40 dias de eutanásia	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Valores da análise para (AON)	43
Gráfico 2 Valores da análise para (ELCOI)	44
Gráfico 3 - Torque Reverso do GCRT e do GRLX aos 40 dias de eutanásia	45

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Porcentagem

µm = Micrometros (unidade de medida)

ANOVA = Análise de variância

AO = Área de tecido ósseo

AON = Área de óssea neoformada

C = Carbono

Ca = Cálcio

Cl = Cloro (unidade de medida)

Cm = Centímetros (unidade de medida)

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COL-1 = Colágeno

EDS = Energia dispersiva

EDTA = Etilenodiaminotetracético

ELCOI = Extensão linear de contato entre tecido ósseo de superfície do implante

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

CRT = Grupo Controle

RLX = Grupo Raloxifeno

HE = Hematoxilina e Eosina

JPEG = Joint Photographics Experts Group

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

Mg/Kg = Miligrama por quilo (unidade de medida)

Mg/Kg/dia = Miligrama por quilo (unidade de medida) por dia

Mg/ml = Miligrama por mililitro (unidade de medida)

ml = Mililitro (unidade de medida)

ml/Kg = Mililitro por quilo (unidade de medida)

mm = Milímetro (unidade de medida)

Mol.L = Mol litro (unidade de medida)

MSRE = Modulador seletivo de receptor estrogênico

N = Nitrogênio

N.cm = Newton centímetro (unidade de medida)

Na = Sódio

NaOH = Hidróxido de Sódio

O = Oxigênio

°C = Graus célsius

OC = Osteocalcina

OPG = Osteoprogesterina

P = Fósforo

P = Nível crítico da estatística (p 0,05)

Ph = Potencial hidrogeniônico

PVP-I = Povidona-iodo

RANK-L = Ligante do receptor ativador nuclear kappa B

Rpm = Rotação por minuto

S = Enxofre

SFC = Solução de fluido corpóreo

Ticp = Titânio puro comercialmente

UNESP = Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3 RESULTADOS	30
4 DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS	38
ANEXO	56

**Análise do reparo ósseo da superfície de implante
revestida com raloxifeno através das análises
topográfica, biomecânica, histológica, histométrica e
imunoistoquímica***

* Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Clinical Implant Dentistry and Related Research (Anexo A)

1 INTRODUÇÃO

O processo de osseointegração dos implantes dentários está diretamente relacionado com fatores locais e sistêmicos do hospedeiro.¹ No entanto, ainda há a necessidade de melhorar as tecnologias desses materiais, especialmente aquelas relacionadas à regeneração óssea.² Uma área atual de pesquisa envolve o tratamento da superfície de implantes para estimulação da osseointegração devido a alteração química ou micromorfológica do implante.³

As superfícies dos implantes podem ser modificadas por métodos como os de subtração ou adição de partículas, buscando um melhor processo de osseointegração.^{4,5} Nos métodos de subtração, a modificação pelo ataque ácido é bastante utilizada, com o objetivo de aumentar a área superficial alterando a microtopografia. Nos métodos de adição, algum tipo de material é acrescentado à camada por meio de revestimento de plasma spray.⁵⁻⁹

O raloxifeno é um modulador seletivo de segunda geração do receptor estrogênico (MSRE), disponível há quase uma década para o tratamento e prevenção de osteoporose em mulheres na menopausa.^{10,11} Este medicamento compete com o estrógeno a nível de receptor, agindo como agonista no tecido ósseo, e antagonista no útero e nos tecidos mamários.^{12,13} Segundo o trabalho de Grady et al., o tratamento com raloxifeno apresenta um risco-benefício favorável para mulheres na menopausa que apresentam alto risco de fratura de vértebras decorrentes da osteoporose ou câncer invasivo de mama.¹⁴ Como a osseointegração dos implantes e a osteoporose possuem uma fisiologia óssea semelhante, o tratamento para osteoporose pode ser executado para melhorar a osseointegração e a qualidade óssea.^{15,16}

Em um estudo com implantes em ratos que foram induzidos à osteoporose e tratados com dois diferentes medicamentos, raloxifeno e alendronato, observou-se que os implantes realizados no grupo raloxifeno apresentaram melhores resultados histológicos, de contato osso implante e de torque reverso.¹⁷

Outro trabalho, também avaliando comportamento histológico, comparou implantes com superfície tratada com raloxifeno e alendronato em tíbia de ratos. Os

autores concluíram que o grupo controle e raloxifeno mostraram resultados semelhantes, porém o grupo raloxifeno apresentou redução do tempo para osseointegração, além de ter efeito positivo com a liberação local do medicamento.¹⁸

O objetivo deste estudo foi avaliar a interface osso/implante após a instalação de implantes de titânio comercialmente puro (Ti-cp) com a superfície tratada por duplo ataque ácido e por deposição de raloxifeno nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias. As hipóteses nulas testadas foram: (1) não haveria diferença entre os grupos (CRT e RLX) em relação à neoformação óssea; e (2) não haveria diferença entre os tempos de análise (7, 15, 30 e 40 dias) em relação à neoformação óssea dos grupos CRT e RLX

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, protocolo 2015-00612.

Delineamento experimental

Setenta e dois ratos foram selecionados para o estudo. Cada animal recebeu um implante em cada tíbia. Os mesmos animais foram enquadrados nos seguintes grupos experimentais, de acordo com o tratamento de superfície recebido pelo implante (n=36): 1-Grupo Controle (CRT): implante de titânio de superfície de duplo ataque ácido instalado na tíbia esquerda; 2-Grupo Raloxifeno (RLX): implante de titânio com superfície modificada a base de fosfato de cálcio foi instalado na tíbia direita.

Foi utilizado um total de 144 implantes com medidas de 1,6mm de diâmetro e 3,0mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) na pesquisa. Metade dos implantes (72 unidades) recebeu tratamento

de duplo ataque ácido na superfície; e a outra metade (72 unidades) recebeu tratamento à base de raloxifeno.

Foram realizadas análises histológica, histométrica (em relação à área óssea neoformada; e em relação à análise de extensão linear de contato entre tecido ósseo e superfície do implante) e imunoistoquímica nos espécimes obtidos a partir dos implantes nas tíbias, nos tempos de 7, 15, 30 e 40 dias após a cirurgia.

Tratamento das superfícies dos implantes

1^a Fase: Modificação por ácido:

Nesta fase, a superfície do implante de Ti-cp sofreu uma subtração ácida por meio de banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico (Figura 1). Todos os 144 implantes de titânio receberam este tratamento. Setenta e dois implantes foram separados para o grupo CRT, e os outros 72 foram para a segunda fase do preparo.

2^a Fase: Deposição de raloxifeno pelo método biomimético nos implantes teste:

Nesta outra fase, os implantes tiveram sua superfície modificada por raloxifeno segundo o método biomimético de modificação de superfície¹⁸⁻²⁰ em dois ciclos. Primeiramente os implantes foram imersos em 50ml de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (5,0 Mol.L-1) e incubados em estufa por um período de 24 horas a 60°C para ativação da superfície. Após, os implantes removidos da solução de NaOH e mantidos em estufa por um período de três horas a 60°C para secagem da superfície. Em seguida, os implantes foram imersos em solução de fluido corpóreo (SFC) modificada, que simula os fluidos corpóreos por apresentar composição iônica e o potencial hidrogeniônico (pH) semelhantes aos do plasma sanguíneo. Os implantes permaneceram imersos nesta solução (pH 7.25) por um período de quatro dias, em estufa a 37°C, para se obter um recobrimento composto por raloxifeno. A SFC foi trocada a cada 24 horas para que fosse mantida a quantidade de íons em solução (Figura 2). Por fim, os implantes foram submetidos à três banhos: 1º) Em água oxigenada volume 10 por quatro horas, com trocas periódicas de hora em

hora; 2º) Em solução salina fisiológica 0,9% por dez minutos; 3º) Lavagem rápida em álcool absoluto. Após os banhos, os implantes foram mantidos em estufa por um período de três horas a 60°C para secagem da superfície.

Procedimento cirúrgico para instalação dos implantes

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de oito horas. A anestesia por sedação foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) na dosagem de 10mg/Kg, e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3ml/Kg na metáfise tibial.

A tibia foi acessada após prévia tricotomia da região lateral direita e esquerda e antisepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10% associado à 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos. As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, Frankfurt, Alemanha), uma incisão linear por planos anatômicos de 1cm foi feita na região lateral da metáfise tibial (Figura 3A). A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, Frankfurt, Alemanha) o suficiente para a exposição da porção lateral da metáfase tibial (Figura 3B).

Após exposição do tecido ósseo, foi realizada osteotomia bi-cortical com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro (Figura 3C e 3D) montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Santa Catarina, Brasil), que por sua vez estava conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus,

Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Cada animal recebeu dois implantes de titânio com travamento e estabilidade inicial, sendo um em cada metáfise tibial (Figuras 3E-G). Na tíbia direita foi instalado um implante de 1,6 x 3,0mm com superfície modificada à base de raloxifeno e na tíbia esquerda um implante de 1,6x3,0mm com superfície com duplo ataque ácido.

Finalizada a instalação dos implantes, o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos. O plano muscular foi suturado por pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). No plano cutâneo, a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1 ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica 1mg/kg por dia (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

Análise histológica

Processamento para parafina:

Após o período de 48 horas de fixação em formol, 64 amostras sofreram descalcificação em etilenodiaminotetracético (EDTA) 20% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, São Paulo, Brasil), com trocas semanais da solução por um período de quatro a seis semanas. Já descalcificadas, as peças foram desidratadas utilizando uma sequência de álcoois 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II, 100 III e álcool/xilol (1:1) com trocas de hora em hora. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada uma hora e 45 minutos para posterior inclusão em parafina (Figura 4) para obtenção de cortes com 5µm de espessura e montados em lâminas. Algumas lâminas foram

separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE), tricrômio masson e outras para as reações de imunoistoquímica.

Previamente à realização das análises histométrica e imunoistoquímica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceu quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc., Nova Jersey, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos Joint Photographics Experts Group (JPEG) e posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

Processamento para inclusão em resina composta:

Para o processamento de inclusão em resina, 64 amostras foram colocadas em formalina neutra tamponada a 10%. Em seguida, foi realizada a desidratação dessas peças em concentrações crescentes de etanol (60-100%) e, posteriormente, infiltração em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co., Wehrheim, Alemanha). Os blocos contendo implante e tecido ósseo peri-implantar foram cortados em um ponto central, empregando-se um sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As lâminas obtidas apresentaram espessura de aproximadamente 50 µm e foram coradas com azul de Estevenel e vermelho de Alizarina. As imagens foram analisadas em microscópio óptico (DIASTAR, Leica Reichert & Jung products, Alemanha) e capturadas por meio de uma câmera fotográfica digital Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica

Microsystems, Alemanha), com resolução de 1.3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz comum e ao computador.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ. Foram calculadas, em porcentagem, a extensão linear de contato entre tecido ósseo de superfície do implante (ELCOI) e a área óssea neoformada (AON), compreendendo as regiões cortical e medular da tíbia na região implantada. Os valores de ELCOI e AON foram comparados para cada grupo entre si, nos quatro períodos de eutanásia (7, 15, 30 e 40 dias) e para os diferentes grupos em cada período de avaliação.

Análise histométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems Ltda., Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região do implante instalado na metáfise tibial. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ Java 1.8 (Figuras 5A-D). Foram utilizadas as imagens obtidas em aumento de 400x e calculada, em porcentagem, a área de tecido ósseo presente (AO) entre as três espiras mais coronárias, localizadas em osso cortical em cada lado do implante.

Análise imunoistoquímica

Para esta análise foram utilizadas lâminas separadas durante o processamento de inclusão em parafina. Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina (OPG) (Goat anti-opg SC21038 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANKL) (Goat anti-rankl SC7627 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), Osteocalcina (OC) (Goat anti-ocSC18319 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e Colágeno-I (COL-1) (Goat anti-COL-I SC8788 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). O anticorpo secundário biotilado será o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin- SP-AffiniPure, donkey anti-goat imunoglobulina E (IgG) 705065147– Jackson Immunoresearch Laboratories, Pensilvânia, EUA). Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) bem como a expressão das proteínas OPG, RANKL, OC e COL-1, acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, Leica Imaging Manager-IM50 Demo Software, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação,²¹ para ambos os grupos (Tabela 1). O avaliador desconheceu o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise.

Foram selecionados os períodos de 15, 30 e 40 dias dos grupos CRT e RLX para a análise imunoistoquímica. Não foram utilizadas as lâminas do período de 7

dias, pois não acrescentariam diferenças significativas em comparação entre períodos do mesmo grupo estudado ou entre os grupos estudados.

Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia energia Dispersiva de Raio X

Os implantes foram analisados quanto à topografia, pré e pós-instalação nas tíbias dos animais, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) e finalmente, a espectrometria de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a formação da película de óxido e sua composição.

Análise Biomecânica (Torque-Reverso)

No momento da eutanásia no período de 40 dias, os implantes foram reabertos para exposição e realização do torque reverso. Um monta-implante (Implalife Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e um torquímetro analógico (15-BTG, Tohnichi, Tokyo, Japan) foi acoplado ao monta-implante. Um movimento anti-horário foi aplicado aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo 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). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística.

Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. Os testes foram conduzidos através de software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América), sendo realizados o teste T com pós teste Mann-Whitney para os valores do torque-reverso e análise de variância (ANOVA) 2 fatores, com pós teste Tukey para os valores da AON e ELCOI, utilizados para análise estatística em estudos na área de saúde, com relevância de ($p < 0.05$).

3 RESULTADOS

Análise histológica

Não foi observado processo inflamatório associado ao RLX em qualquer um dos períodos.

Grupo controle (CTR)

No período de 7 dias observou-se na interface osso/implante principalmente tecido conjuntivo e matriz de osteóide sendo depositada de forma homogênea na região de vale e entre as espiras, com formação de trabéculas ósseas finas, principalmente na região cortical, com pouca formação de tecido ósseo em área medular. Além disso, notou-se a presença de poucos vasos sanguíneos, entre a região de espiras, com um entremeado de tecido conjuntivo e pouco tecido ósseo neoformado, evidenciando o início da angiogênese (Figura 6).

No período de 15 dias observou-se a formação de trabéculas mais espessas em comparação ao período anterior, principalmente na região da interface osso/implante, apresentando matriz osteóide entremeada às áreas de tecido ósseo neoformado, que por sua vez, apresenta-se com inúmeras células osteoblásticas e osteoclastos na periferia, indicando remodelação do tecido. Além disso, foi possível notar o aumento do acúmulo de vasos sanguíneos em tecido conjuntivo passando por processo de mineralização (Figura 7).

O período de 30 dias é caracterizado pela fase de maior taxa de remodelação óssea. Com isso, pode-se destacar a presença de tecido ósseo disposto em finas trabéculas na região de superfície da interface osso/implante com células osteoblásticas, dando destaque para o tecido conjuntivo frouxo em maior quantidade sob esta camada de tecido ósseo neoformado, com inúmeros osteoclastos localizados na interface da área de tecido ósseo. Assim como também apresenta vasos sanguíneos calibrosos entremeados em tecidos ósseo e conjuntivo, de forma dispersa (Figura 8).

Aos 40 dias, observou-se grande quantidade de tecido ósseo, evidenciando uma formação mais madura desse tecido quando comparado aos outros períodos, com menor quantidade de tecido conjuntivo entre as espiras, com a presença de vasos sanguíneos e matriz osteóide entremeada em regiões de tecido ósseo, que por sua vez, possui inúmeros osteoblastos, principalmente na área de interface osso/implante (Figura 9).

Grupo modificado por raloxifeno (RLX)

No período de 7 dias observa-se na região de interface osso/implante a presença de tecido conjuntivo, com aglomerados de vasos sanguíneos e matriz osteóide disposta de forma homogênea contornando a região periférica da interface osso/implante. Quando observado as áreas ósseas neoformadas, estas apresentam-se com finas trabéculas entremeadas no tecido conjuntivo (Figura 10).

Aos 15 dias observa-se maior expressão de trabéculas ósseas, sendo mais espessas quando comparadas com o período anterior, e com presença de osteoblastos e osteócitos em sua porção mais interna, dispondo-se de forma entremeada ao tecido conjuntivo, que por sua vez, apresenta-se com maior expressão de vasos sanguíneos dispersos em toda a região do delta entre as espiras, inclusive abaixo da região do vale do implante e com a presença de matriz osteóide entre o tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo (Figura 11).

No período de 30 dias observa-se maior expressão de trabéculas ósseas neoformadas e matriz de osteóide disposta tanto na região de interface osso/implante quanto entremeado no tecido conjuntivo, principalmente em região medular. Assim como também é possível notar, no tecido conjuntivo, maior prevalência de vasos sanguíneos (Figura 12).

Aos 40 dias observou-se trabéculas ósseas mais espessas, com características de tecido mais maduro na região cortical. Porém, na região medular, ainda apresentou grande quantidade de tecido conjuntivo, com formação óssea apenas na interface osso/implante na maioria das amostras. Entretanto, o tecido conjuntivo presente entre as espiras se apresentou de forma mais densa e

organizada quando comparado ao grupo CRT. Além disso, notou-se a presença de vasos sanguíneos calibrosos em meio ao tecido ósseo. (Figura 13).

Análise histométrica

Após a realização da histometria, os dados foram submetidos à análises estatística. Por meio dos dados submetidos à análise da AON, foi possível observar, na comparação entre os grupos, diferença estatística entre os grupos CRT e RLX durante os períodos de 7 ($p=0,005$) e 40 dias ($p=0,04$).

Já na comparação intergrupo, foi possível observar diferença estatística entre os períodos 7, 15 e 30 dias quando comparados aos 40 dias para o grupo CRT; e no grupo RLX, entre os períodos 15, 30 e 40 dias, quando comparados aos 7 dias (Tabela 2; Gráfico 1).

Para os dados submetidos à análise de ELCOI, foi possível observar diferença significativa no grupo RLX, entre os períodos de 7 e 15 dias ($p=0,003$). Além disso, na comparação entre os dois grupos, observou-se diferença estatística durante o período de 7 dias ($p<0,001$). Os períodos de 15, 30 e 40 dias não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) (Tabela 3; Gráfico 2).

Análise imunoistoquímica

Colágeno (COL1)

A imunomarcção para COL-1, nos períodos de 15 e 30 dias do CRT, apresentou-se leve. Em contrapartida, no grupo RLX apresentou-se moderada. Neste contexto, é importante salientar a ativação proteica destes períodos iniciais, proliferativos, e de remodelação dado pelo grupo RLX, apresentando uma linhagem de osteoblastos e matriz de tecido conjuntivo expressiva. Visto que apenas no período de 40 dias ambos os grupos apresentaram imunomarcção semelhantes, de leve a moderada. Com isso, destacou-se o comportamento do grupo RLX, no qual houve o aumento da linhagem de osteoblastos e de matriz conjuntiva. Já em relação

ao CRT, foi dado um ponto de equilíbrio do metabolismo ósseo dentro deste intervalo de tempo, no qual os osteoblastos se encontram concentrados na região mais interna entre as espiras do implante (Figura 14).

Ligante do receptor ativador nuclear kappa b (RANK-L)

A imunomarcção dos períodos de 15, 30 e 40 dias apresentaram-se distintas entre os grupos estudados. Visto que o comportamento do grupo CRT apresentou imunomarcção leve aos 15 e de leve a moderada aos 30 dias. Em contrapartida, ao analisar o grupo RLX, a imunomarcção apresentou-se moderada em ambos períodos.

Por fim, aos 40 dias, o grupo CRT apontou imunomarcção de leve a moderada e o grupo RLX leve, resultando na marcação positiva na matriz extracelular e nas células da linhagem osteoblástica (Figura 15).

Osteoprotegerina (OPG)

No período de 15 dias, a imunomarcção para OPG apresentou-se leve em ambos os grupos estudados e, aos 30 dias, a imunomarcção para OPG apresentou-se moderada para ambos os grupos.

No entanto, aos 40 dias, enquanto o grupo CRT mostrou uma imunomarcção moderada, o grupo RLX apresentou imunomarcção leve. Com isso, tem-se que os scores dos períodos de 15 e 40 dias do grupo RLX apresentaram imunomarcção leve, corroborando assim com a análise histológica realizada, mostrando pouco tecido mineralizado (Figura 16).

Osteocalcina (OC)

No período de 15 dias, o grupo CRT apresentou imunomarcção leve, enquanto o grupo RLX moderada. Em sequência, aos 30 dias, o grupo CRT

apresentou imunomarcacão moderada, e o RLX leve a moderada. Por fim, aos 40 dias, o grupo CRT mostrou imunomarcacão leve a moderada, e o grupo RLX leve.

Ao avaliar o comportamento do grupo RLX, visando a imunomarcacão da OC, tem-se que este grupo revelou ter uma resposta rápida para a ativacão celular dos osteoblastos, porém, com ao a longo prazo quando comparado ao grupo CRT. Este resultado leva a entender a razão da não-significância estatística quando realizado a análise por torque-reverso, pois havia pouco tecido mineralizado sendo marcado aos 40 dias pelo grupo RLX, não destacando-se em relação ao grupo CRT (Figura 17).

Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios X

A MEV revela no grupo controle uma superfície rugosa, porém mais homogênea, com estrutura mais espessa (Figura 18 A e C). Enquanto a superfície do grupo tratado se apresenta mais rugosa, com partículas de raloxifeno depositadas entre as espiras (Figura 18 B e D).

Na análise topográfica foi possível observar grande quantidade de elementos na superfície tratada com Raloxifeno, além do titânio. Como oxignio (O), Cálcio (Ca), Cloro (Cl), Sódio (Na), Fósforo (P), Enxofre (S) (Figura 19 A). Diferente do grupo controle, o qual mostrou a presença de 100% de titânio na superfície (Figura 19 B). Isso se deve ao tipo de tratamento, pelo tratamento com raloxifeno adicionar partículas na superfície do implante, enquanto o tratamento com duplo ataque ácido ocorre por subtração de substância.

Análise Biomecânica (Torque Reverso)

Adotando o nível de significância (p) $p < 0,05$. Não foi observada diferença estatística ($p = 0,130$) para os valores de torque reverso entre os GCRT e GRLX para o tempo de 40 dias (Gráfico 3) (Tabela 4).

4 DISCUSSÃO

Os resultados descritos no presente estudo foram esclarecedores para o entendimento do comportamento do RLX em situações sistêmicas normais, visando compreender se este medicamento em si poderia alterar o processo de neoformação óssea, como já relatado na literatura.¹⁶ Os dados qualitativos e quantitativos obtidos demonstraram diferenças entre grupos (CTR and RLX) e entre os tempos de análise (7, 15, 30 e 40 dias), rejeitando, portanto, ambas as hipóteses nulas do estudo.

As análises de espectrometria recentemente encontradas na literatura indicam que o raloxifeno promove a liberação de componentes químicos de ação local como: Carbono (C), O, P, Ca e Na, além de S e Nitrogênio (N). Corroborando com estes resultados, este estudo apresentou os elementos químicos: Na, O, Ca, P e S; e em aditivo o Cl. Sendo que a presença de S comprova a adesão bem-sucedida do medicamento, com liberação progressiva do raloxifeno¹⁸

Além da composição química da superfície do implante, a caracterização topográfica favorece a proliferação celular devido à maior porosidade¹⁸. Da mesma forma, a topografia de superfície apresentou maior porosidade no grupo modificado por raloxifeno em relação ao grupo controle, corroborando com a literatura. Além disso, em maior aumento, é possível observar a deposição de partículas de raloxifeno na superfície dos implantes modificados.

Os parâmetros referentes à análise biomecânica disponíveis na literatura revelam que os ratos correspondentes ao grupo tratado sistemicamente com raloxifeno, quando induzidos a osteoporose, não apresentaram valores estatísticos significantes ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle (não induzido osteoporose),^{17,22} o que corrobora com os resultados do presente trabalho, que por sua vez, não testou animais sistemicamente comprometidos e não apresentou diferença estatística de torque-reverso entre o GCRT e GRLX aos 40 dias. Em justificativa, a análise de imunoistoquímica apresenta alteração da marcação para a OC aos 40 dias, em que o GRLX denota imunomarcação leve, enquanto o GCRT de leve a moderada. Ou seja, o GCRT, neste período, apresentou maior quantidade de matriz óssea mineralizada, influenciando em valores superiores aos do GRLX na análise de torque-reverso. Entretanto, vale salientar que também é encontrado na literatura

melhores resultados de torque-reverso do grupo raloxifeno em relação aos demais grupos estudados,^{13,25} evidenciando a necessidade de realização de novos estudos para ratificar tais dados.

Na análise histomorfométrica observou-se que ao comparar o GCRT e o GRLX para os valores obtidos de AON, tanto o período de 7 dias como o período de 40 dias, apresentaram diferença estatística ($p=0,005$ e $p=0,04$, respectivamente). Assim como, no GRLX os períodos de 15, 30 e 40 dias, apresentaram diferença estatística em relação aos 7 dias. Visto que na fase inicial o GRLX se destaca por possuir maior quantidade de tecido conjuntivo em relação ao GCRT. Diante disto, a literatura traz que o grupo modificado por raloxifeno e o grupo controle, apresentaram melhores resultados histológicos, de neoformação óssea em regiões de reparo ósseo, em relação aos demais grupos estudados.^{17,22,25} Em contrapartida, há também estudos que relatam que o alendronato obteve melhores resultados no quesito área óssea neoformada, sendo superior ao grupo raloxifeno, e este foi superior ao grupo controle.¹³

O fato de que o GRLX apresentou mais áreas de tecido conjuntivo em relação ao GCRT, corrobora com a diferença estatística na análise de ELCOI entre o GCRT e GRLX, no período de 7 dias. Além disso, o GRLX apresentou diferença estatística entre os períodos de 7 e 15 dias ($p=0,03$), indicando que houve um aumento considerável da corticalização óssea, apesar de não ter diferença estatística com o GCRT em nenhum dos períodos após os 7 dias, apresentando no fim, resultados semelhantes. No entanto, a literatura traz resultados distintos, pois pesquisas revelam que a superfície de contato na área osso/implante do grupo modificado por raloxifeno, em ratas com osteoporose induzida, apresenta valores superiores ou semelhantes em relação ao grupo controle.^{13,22,25}

A análise de imunoistoquímica indica a atividade do metabolismo ósseo, em outras palavras, do turnover.^{17,22,23,25} Pode-se afirmar que o GRLX teve rápida ativação proteica em relação ao GCRT devido a imunomarcação do GRLX ter sido moderada dos anticorpos OC, RANKL e COL-1 no período de 15 dias; e do GCRT imunomarcação leve. O que dá créditos a ação do raloxifeno em capacidade neoformadora.

No entanto, durante os períodos abordados na análise de imunoistoquímica é possível afirmar que o GCRT teve maior formação de tecido mineralizado em relação ao GRLX, em razão da imunomarcação do anticorpo OC, que é a principal proteína não colagenosa da matriz extracelular do tecido ósseo que caracteriza seu estado de mineralização e seu estágio de maturidade,²⁵ que no GRLX, apontou uma regressão do processo de mineralização, concordando com a análise histológica e histométrica para os valores de AON aos 40 dias.

De acordo com a literatura, partindo do enfoque comparativo entre OPG e RANKL, há evidências de que quando ocorre predomínio da imunomarcação do anticorpo OPG a resposta tecidual tende para formação óssea e, que quando ocorre predomínio de RANKL a resposta tende para reabsorção óssea. Por outro lado, quando não há predominância na imunomarcação entre os anticorpos OPG e RANKL, pode-se afirmar que o grupo alcançou o equilíbrio de remodelação óssea.^{22,25,26} Diante destes critérios de avaliação, pode-se deduzir que o GRLX alcançou o equilíbrio na taxa de remodelação óssea nos períodos de 30 e 40 dias, ao contrário do GCRT, que teve destaque na imunomarcação dos anticorpos OPG, indicando que houve maior neoformação óssea e reforçando a diferença estatística da análise de AON entre os grupos ao 40 dias.

O GRLX apresentou-se equivalente ao GCRT, aos 40 dias, na análise de ELCOI, indicando que no quesito corticalização de superfície ambos tiveram comportamento equivalente. No entanto, em geral, o GRLX não alcançou o seu platô de neoformação óssea, como foi evidenciado pelo GCRT. As imunomarcações do GRLX de RANKL e OPG apresentaram-se leve, indicando que se alcançou o turnover ósseo.²⁶ Além disso, o aumento da imunomarcação do COL-1 contribuiu na mediação da cascata de sinal para a expressão de osteoblastos maduros e para a mineralização da matriz extracelular,²⁴ observado ao longo dos períodos estudados na análise de imunoistoquímica do GRLX, mantendo-se moderado aos 15 e 30 dias e, de leve a moderado aos 40 dias.

Podem ser citadas como limitações do presente estudo, o modelo experimental em tíbias de ratos, que não reflete perfeitamente a condição oral em que esses implantes seriam submetidos, como uma carga mastigatória funcional. O modelo apenas representa uma fase do período inicial de cicatrização, sem

observação desses implantes a longo prazo sob carga mastigatória. É indicada a realização de ensaios clínicos futuros para avaliar sua eficácia em situações mais aproximadas da realidade humana, bem como estabelecer diretrizes sobre a seleção do paciente, tempo e forma da administração do RLX.

Diante do exposto, foi possível concluir que o raloxifeno utilizado para modificação da superfície do implante apresentou características positivas de neoformação óssea ao redor do implante, porém com a quantidade formada muito semelhante ao grupo controle, e sem variação significativa entre todos os tempos de análise. Outros estudos são necessários para uma compreensão mais ampla do mecanismo de ação do raloxifeno e sua aplicação local.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, pela concessão de bolsa Doutorado ao primeiro autor (REIS ENRC).

REFERÊNCIAS

1. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:251–262.
2. Younis I, Gault D, Sabbagh W, Kang NV. Patient satisfaction and aesthetic outcomes after ear reconstruction with a Branemark-type, bone-anchored, ear prosthesis: a 16 year review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:1650–1655.
3. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amourig Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23:844–854.
4. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25:889–902.
5. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio EJR. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibiae. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:1706–1715.
6. Gagli A, Schultes G, Müller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces: a comparative study. *Biomaterials*. 2000;21:1067–1073.
7. Lavis L, Grevey D, Langlade C, Vannes B. The early stage of the laser induced oxidation of titanium substrates. *Appl Surf Sci*. 2002;186:150–155.
8. Cho AS, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*. 2003;24:4859–4863.
9. Braga FJC, Marques RFC, Almeida-Filho E, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO₄ laser irradiation. *Appl Surf Sci*. 2007;253:9203–9208.
10. Moen MD, Keating GM. Raloxifene: a review of its use in the prevention of invasive breast cancer. *Drugs*. 2008;68:2059–2083.
11. Delmas PD, Ensrud KE, Adachi JD, et al. Efficacy of raloxifene on vertebral

- fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3609-3617.
12. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its valuable option for the prevention of invasive breast clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85:23-29.
 13. Clemett D, Spencer CM. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs.* 2000;60:379-411.
 14. Grady D, Cauley JA, Stock JL, et al. Effect of Raloxifene on all-cause mortality. *Am J Med.* 2010;123:469.e1-469.e7.
 15. Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta- analysis. *PLoS One* 2013;8:e71955.
 16. Apostu D, Lucaciu O, Lucaciu GD, et al. Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. *Drug Metab Rev.* 2017;49:92–104.
 17. 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;44:798-805.
 18. Harmankaya N, Karlsson J, Palmquist A, et al. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta Biomater.* 2013;9:7064-7073.
 19. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite: biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:896- 903.
 20. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, et al. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101:76-84.
 21. Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:1254-1264.

-
22. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20:038003.
 23. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55:52–59.
 24. Saino E, Grandi S, Quartarone E, et al. In vitro calcified matrix deposition by human osteoblasts onto a zinc-containing bioactive glass. *Eur Cell Mater.* 2011;21:59-72.
 25. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2018 Jan;22(1):255-265.
 26. Yogui FC, Momesso GAC, Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Okamoto R. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170329.
-

TABELAS

Tabela 1 Escores e frequência de porcentagem para quantificação das imunomarcações.

Quantidade de Marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de marcação	-	0%
Marcação positiva	+	20% (Entre 10 à 30%)
Marcação superpositiva	++	60% (Entre 50 à 70%)
Marcação hiperpositiva	+++	90% (Entre 80 à 100%)

Tabela 2 Resultados em porcentagem da análise de histometria para área óssea neoformada (AON) (média $\pm$ desvio padrão) na interface osso/implante dos grupos experimentais (CRT e RLX) nos tempos de análise de 7, 15, 30 e 40 dias.

Tempo de Análise	Grupo experimental		Valor de p
	CRT	RLX	
7 dias	0,20 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	0,02 $\pm$ 0,02 ^{Ba}	<0,005*
15 dias	0,120 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	0,16 $\pm$ 0,15 ^{Bb}	<0,526
30 dias	0,15 $\pm$ 0,27 ^{Aa}	0,10 $\pm$ 0,06 ^{Bc}	<0,078
40 dias	0,17 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,15 $\pm$ 0,13 ^{Bd}	<0,40*
Valor de p	<0,046*	<0,46*	

*: indica valor estatisticamente significativa ($p < 0,05$ por ANOVA dois fatores); A e B: indicam a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: indicam a diferença entre os tempos de análise dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey).

Tabela 3 Resultados em porcentagem da análise de histometria para extensão linear de contato entre tecido ósseo e superfície do implante (ELCOI) (média $\pm$ desvio padrão) na interface osso/implante dos grupos experimentais (CRT e RLX) nos tempos de análise de 7, 15, 30 e 40 dias.

Tempo de Análise	Grupo experimental		Valor de p
	CRT	RLX	
7 dias	10,04 $\pm$ 8,15 ^{Aa}	3,07 $\pm$ 2,02 ^{Ba}	<0,001*
15 dias	12,66 $\pm$ 2,82 ^{Aa}	14,16 $\pm$ 4,75 ^{Bb}	<0,362
30 dias	14,99 $\pm$ 5,09 ^{Aa}	10,76 $\pm$ 6,80 ^{Bc}	<0,354
40 dias	21,44 $\pm$ 5,23 ^{Aa}	16,49 $\pm$ 7,57 ^{Bd}	<0,601
Valor de p	<0,003*	<0,003*	

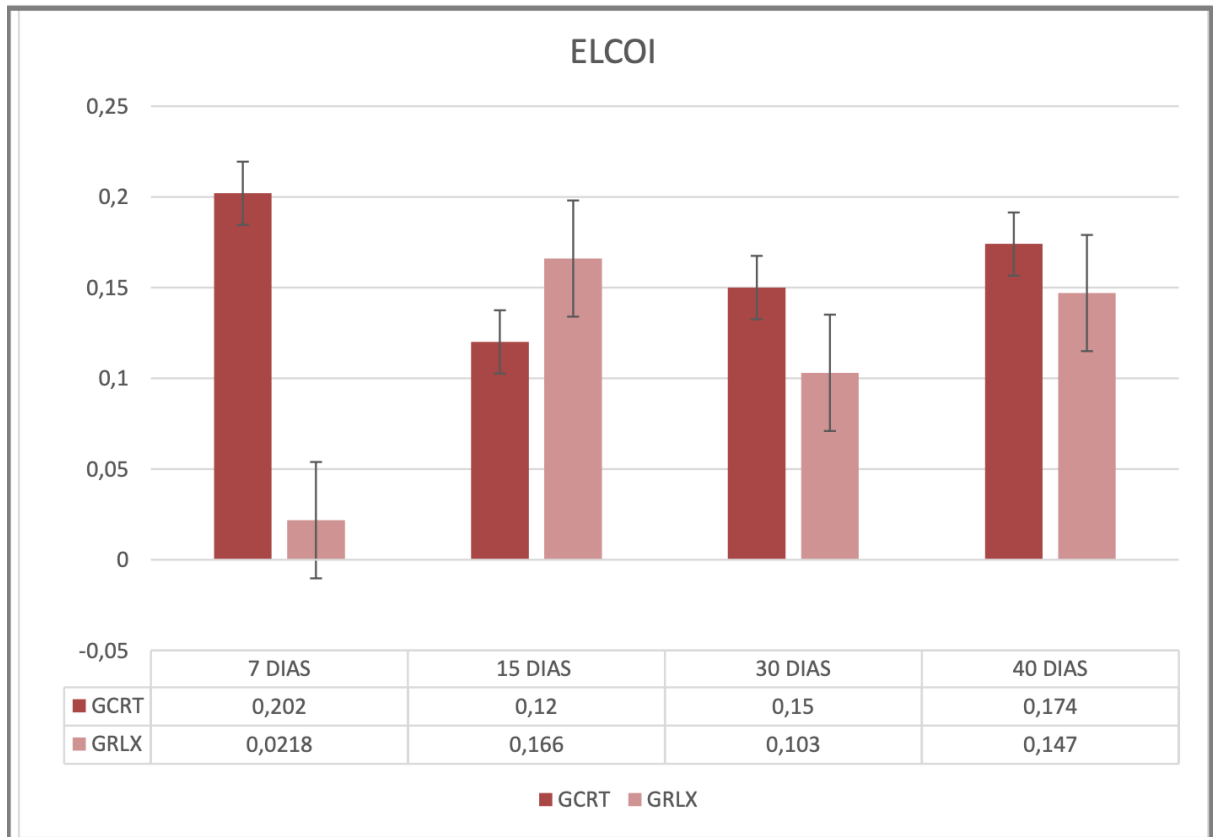
*: indica valor estatisticamente significativa ($p < 0,05$ por ANOVA dois fatores); A e B: indicam a diferença entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey); a, b e c: indicam a diferença entre os tempos de análise dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$ pelo teste de Tukey).

Tabela 4 Valores médios do torque reverso para os GCRT e tratado GRLX, não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Período de Eutanásia	GCRT	GRLX	p
40 Dias	6,25	4,75	0,13

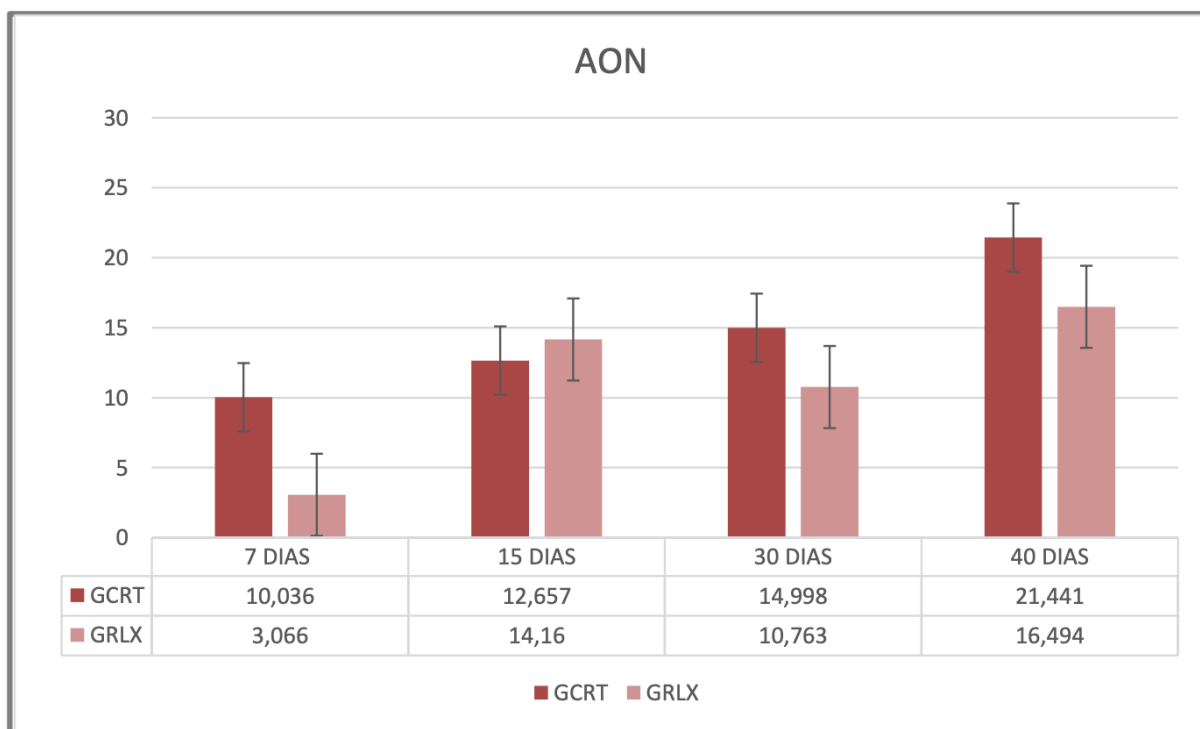
GRÁFICO

Gráfico 1 Valores da análise de histometria para área óssea neoformada (AON) na interface osso/implante dos grupos experimentais (CRT e RLX) nos tempos de análise de 7, 15, 30 e 40 dias.



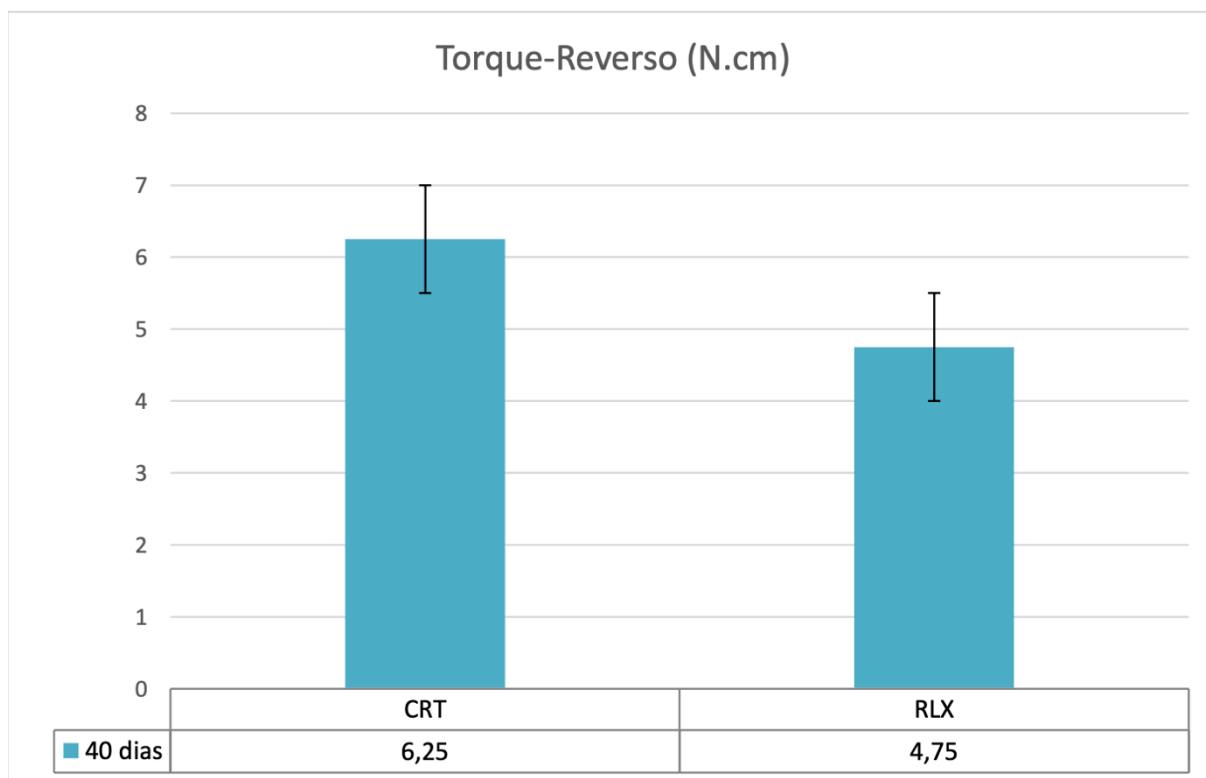
Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

Gráfico 2 Valores da análise de histometria para extensão linear de contato entre tecido ósseo e superfície do implante (ELCOI) na interface osso/implante dos grupos experimentais (CRT e RLX) nos tempos de análise de 7, 15, 30 e 40 dias.



Fonte: Software Sigma Plot 12.0 (San Jose, California, PA, Estados Unidos da América)

Gráfico 3 Adotando o nível de significância (p) $p < 0,05$. Não foi observada diferença estatística ($p=0,130$) para os valores de torque reverso entre os GCRT e GRLX para o tempo de 40 dias



FIGURAS



FIGURA 1 1ª Fase de modificação por ácido grupo CRT. Modificação por subtração ácida em banhos de ácido nítrico (A); Ácido sulfúrico (B) e Ácido clorídrico (C).

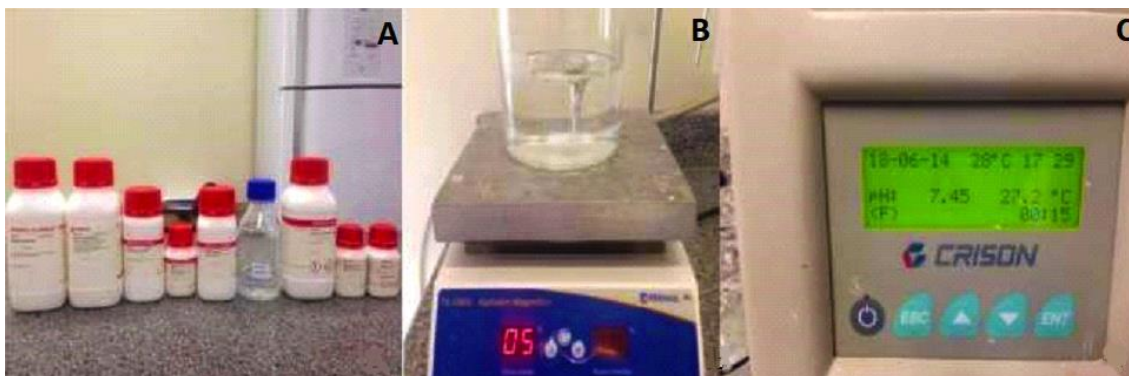


FIGURA 2 Preparação do Simulador de Fluido Corpóreo. Elementos químicos utilizados no preparo o SFC (A); Homogeneização da solução com agitador orbital (B); Medição do pH do SFC (C).

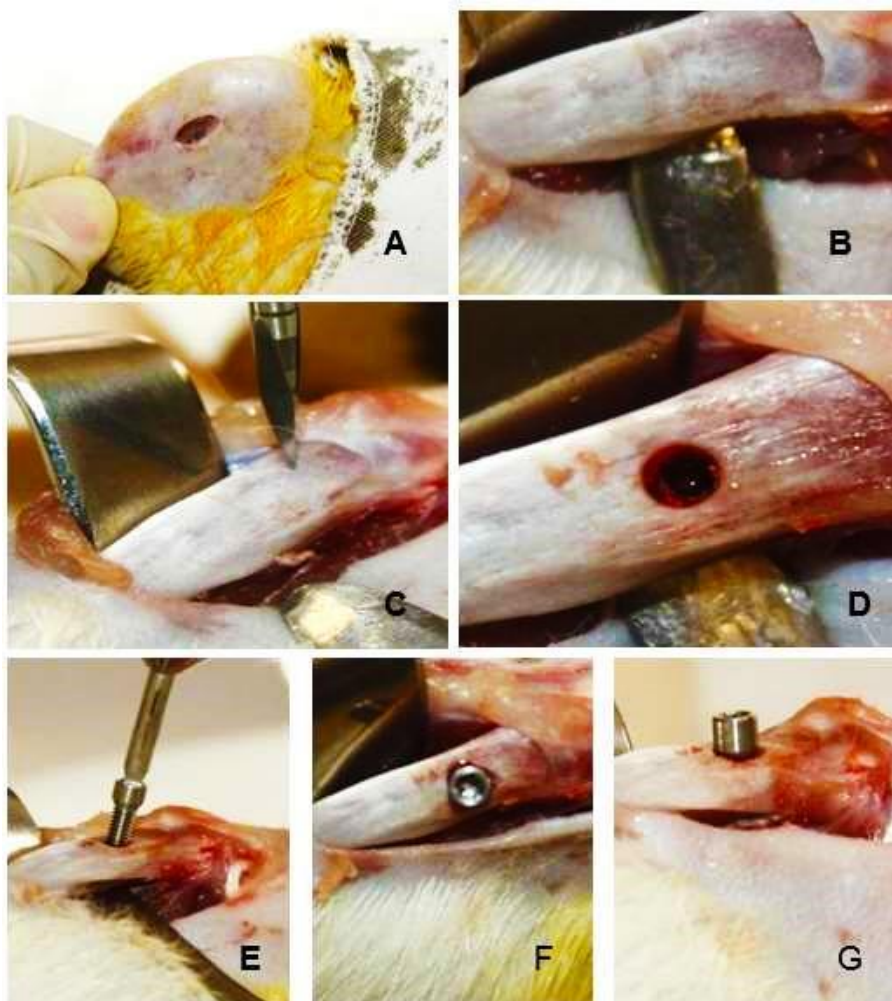


FIGURA 3 Procedimento cirúrgico para a instalação dos implantes. Procedimento cirúrgico realizado bilateralmente. Após tricotomia e antissepsia, foi realizada incisão na região da metáfise tibial **(A)**; Acesso à tibia do animal **(B)**; Osteotomia bicortical com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro **(C)**; Defeito ósseo de 1,4mm criado pela fresa **(D)**; Instalação de implante de 1,6 x 3,0 mm de diâmetro, tratado ou não com raloxifeno **(E)**; Vista superior e lateral de implante instalado bicorticalmente com estabilidade inicial **(F)** e **(G)**.

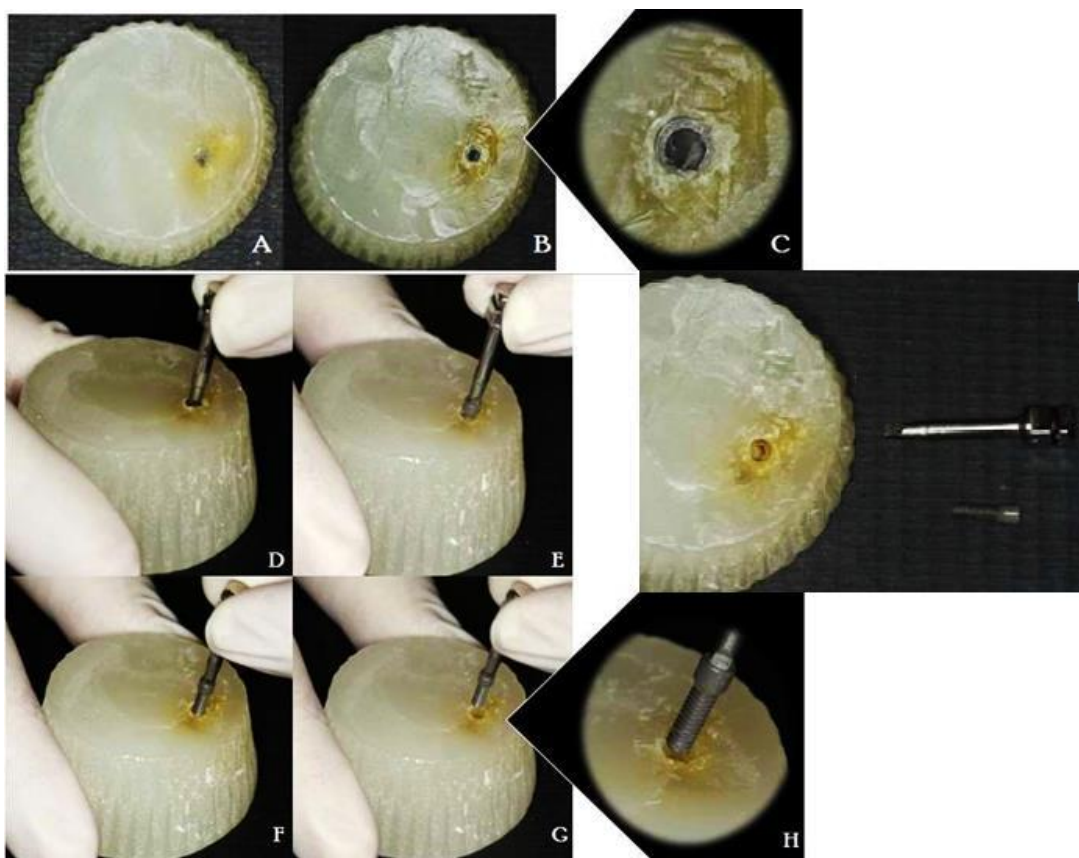


FIGURA 4 Sequência de remoção do implante da peça incluída em parafina.

Remoção do implante da peça incluída em parafina, para posterior reinclusão também em parafina e obtenção de cortes histológicos. Vista superior da peça incluída em parafina, onde é possível observar a presença do implante **(A)**; Vista superior da cavidade feita na peça incluída em parafina para o alcance do implante **(B)**; Vista superior da cavidade feita na peça incluída em parafina para o alcance do implante em maior aumento **(C)**; Vista de perfil do encaixe da chave para remoção do implante acoplada ao implante **(D)**; Vista de perfil do início da remoção do implante por meio de movimentos rotatórios **(E)**; Vista de perfil da remoção do implante por meio de movimentos rotatórios **(F)**; Vista de perfil do implante removido da peça de parafina, estando acoplado a chave de remoção **(G)**; Vista de perfil, em maior aumento, do implante removido da peça de parafina, estando acoplado a chave de remoção **(H)**; Vista superior da peça de parafina com a tábua com o implante removido, sobre a mesa encontra-se a chave para remover implante e o implante que foi removido **(I)**.

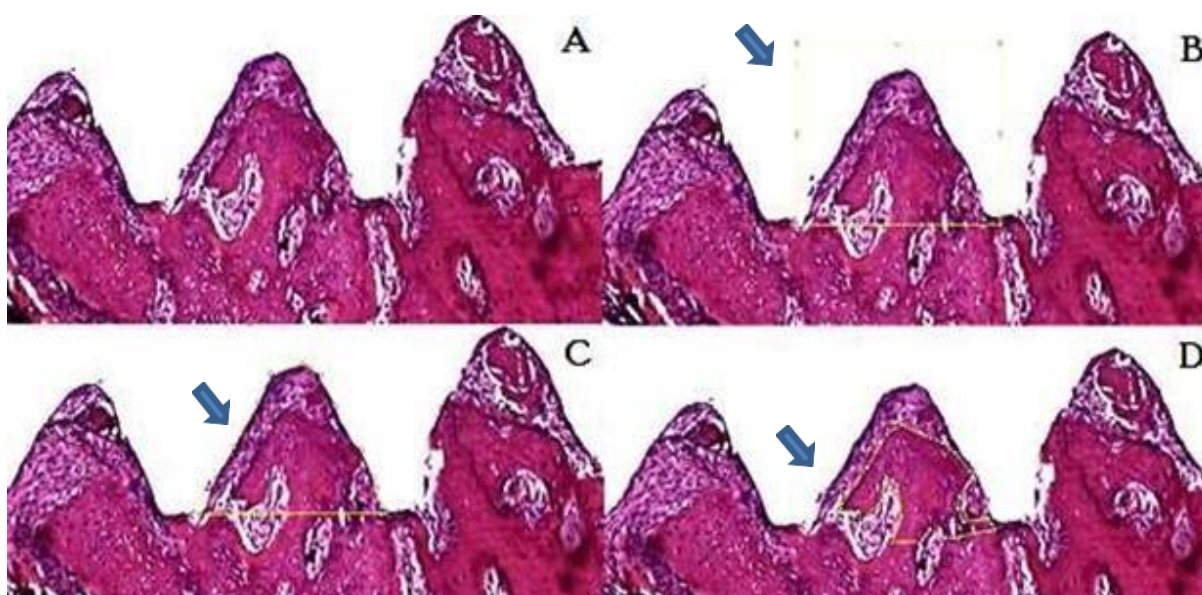


FIGURA 5 Vista da área interface osso/implante selecionada para a análise histológica **(A)**; Seleção de espira pelo programa ImagieJ **(B)**; Cálculo da área total da espira **(C)**; Cálculo da área óssea neoformada por meio da seleção do seu contorno **(D)**.

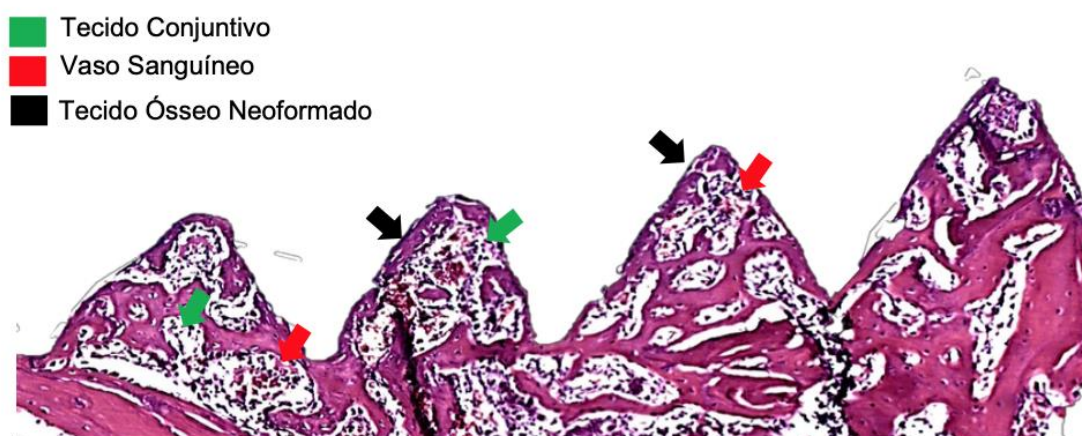


FIGURA 6 Histológico do período 7 dias do grupo CRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

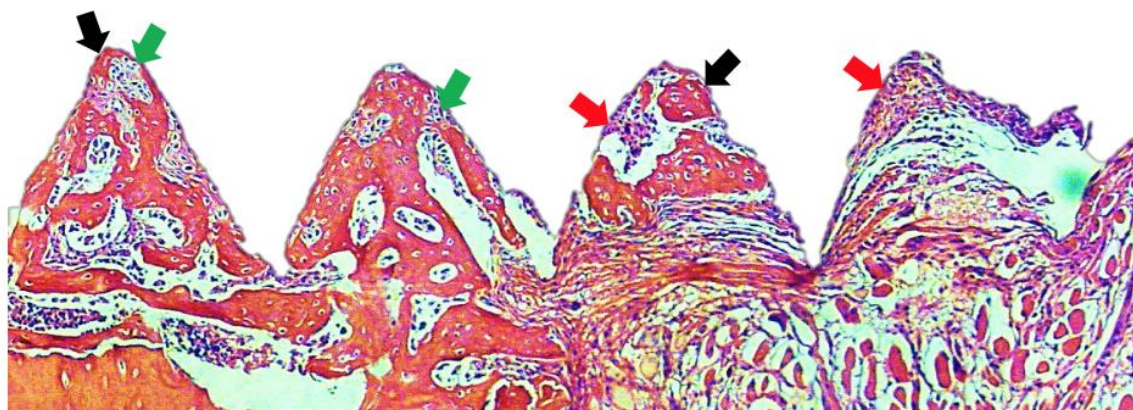


FIGURA 7 Histológico do período 15 dias do grupo CRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

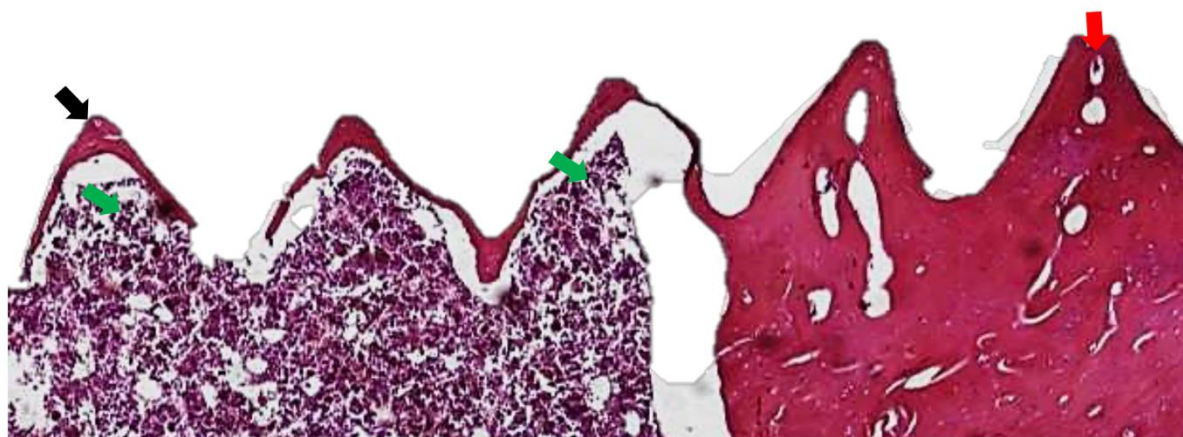


FIGURA 8 Histológico do período 30 dias do grupo CRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

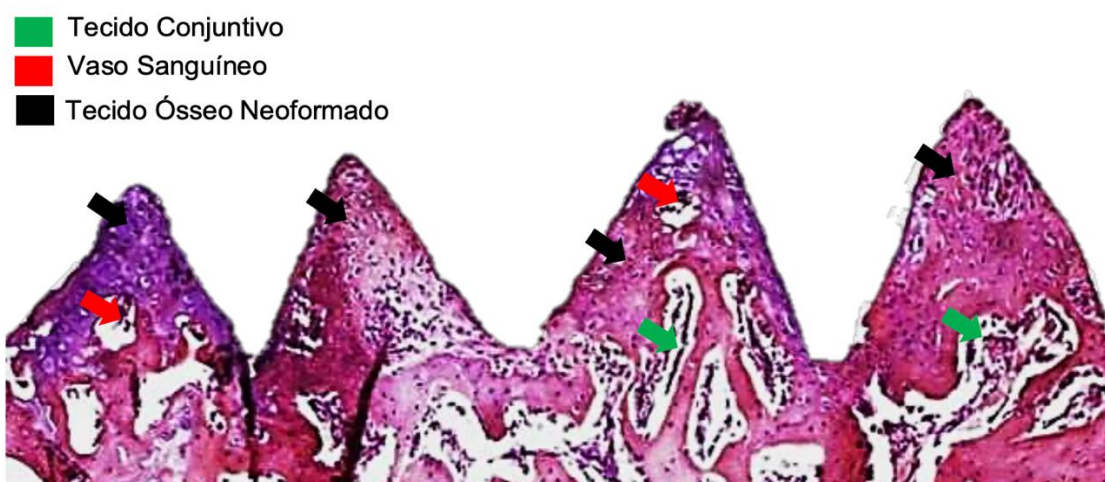


FIGURA 9 Histológico do período 40 dias do grupo CRT, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

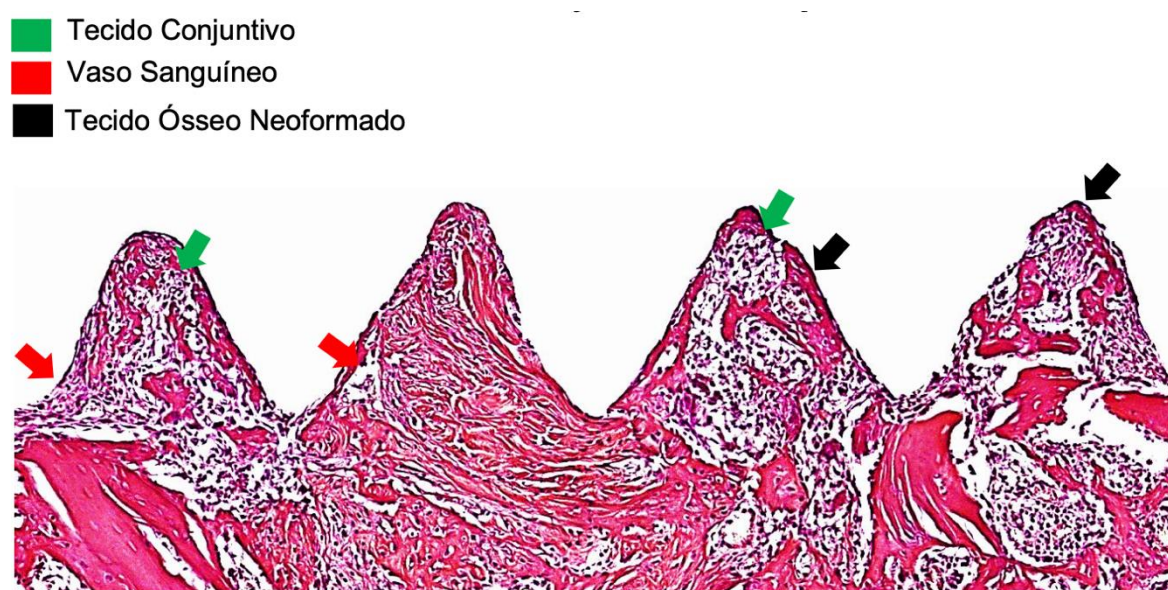


FIGURA 10 Histológico do período 7 dias do grupo RLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

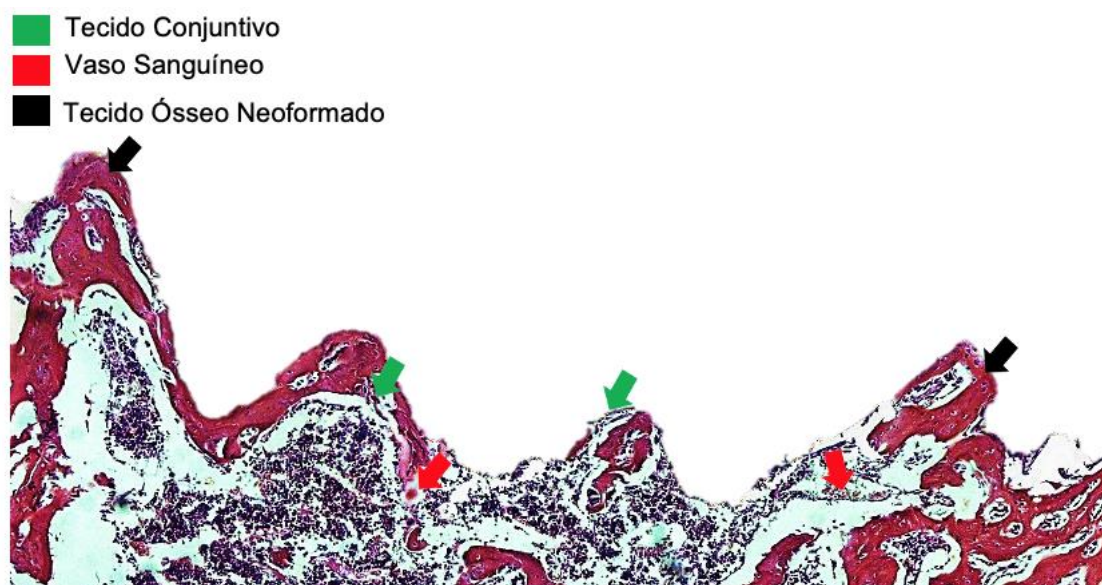


FIGURA 11 Histológico do período 15 dias do grupo RLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

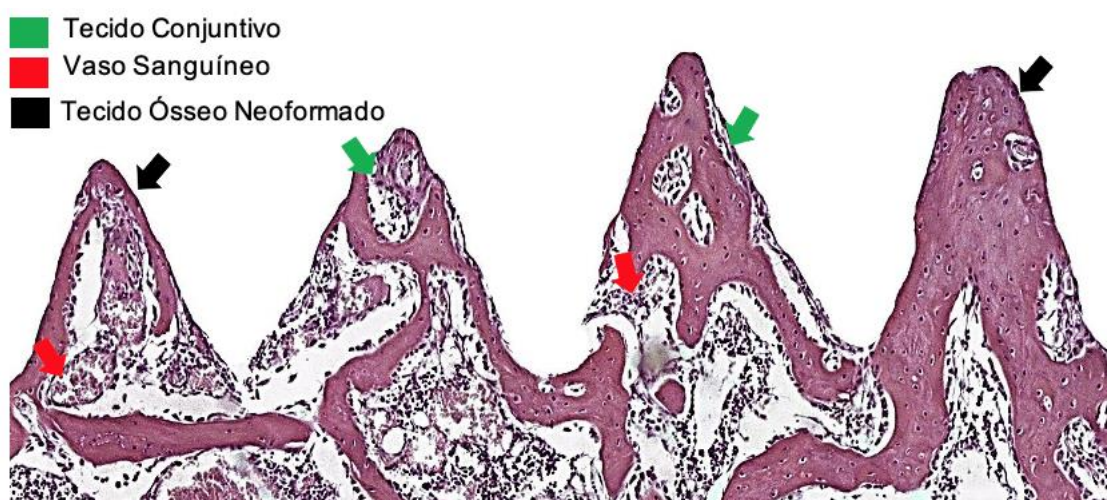


FIGURA 12 Histológico do período 30 dias do grupo RLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

- Tecido Conjuntivo
- Vaso Sanguíneo
- Tecido Ósseo Neoformado

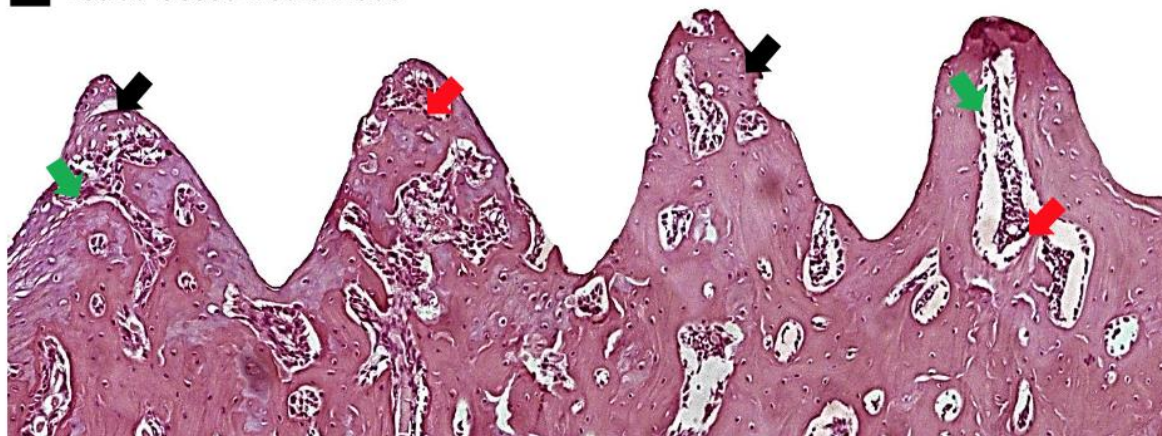


FIGURA 13 Histológico do período 40 dias do grupo RLX, com legenda auxiliar para a identificação do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do tecido ósseo neoformado.

Padrão Adotado para Imonomarcacão:

- ➡ ➡ Leve
- ➡ ➡ ➡ Leve á Moderado
- ➡ ➡ ➡ ➡ Moderado

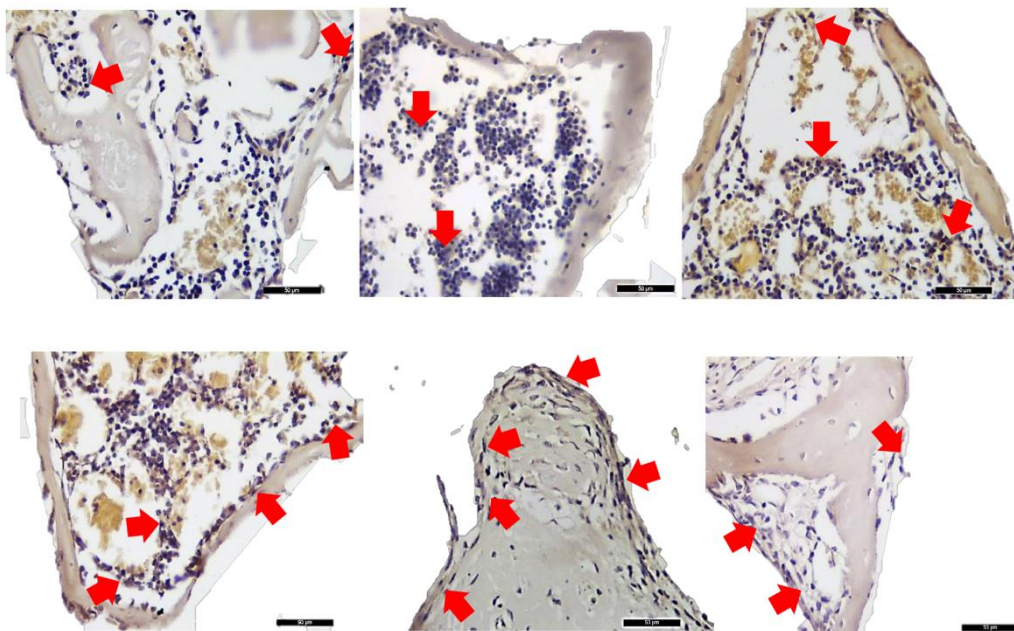


FIGURA 14 Padrão adotado: Imunomarcacão Leve 2 setas; Imunomarcacão Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcacão Moderada 4 setas; Grupo CRT aos 15 dias

apresentou imunomarcacão leve **(A)**; Grupo CRT aos 30 dias apresentou imunomarcacão leve **(B)**; Grupo CRT aos 40 dias apresentou imunomarcacão de leve a moderada **(C)**; Grupo RLX aos 15 dias apresentou imunomarcacão moderada **(D)**; Grupo RLX aos 30 dias apresentou imunomarcacão moderada **(E)** Grupo RLX aos 40 dias apresentou imunomarcacão e leve a moderada **(F)**.

Padrão Adotado para Imonomarcaco:

➡ ➡ Leve
➡ ➡ ➡ Leve  Moderado
➡ ➡ ➡ ➡ Moderado

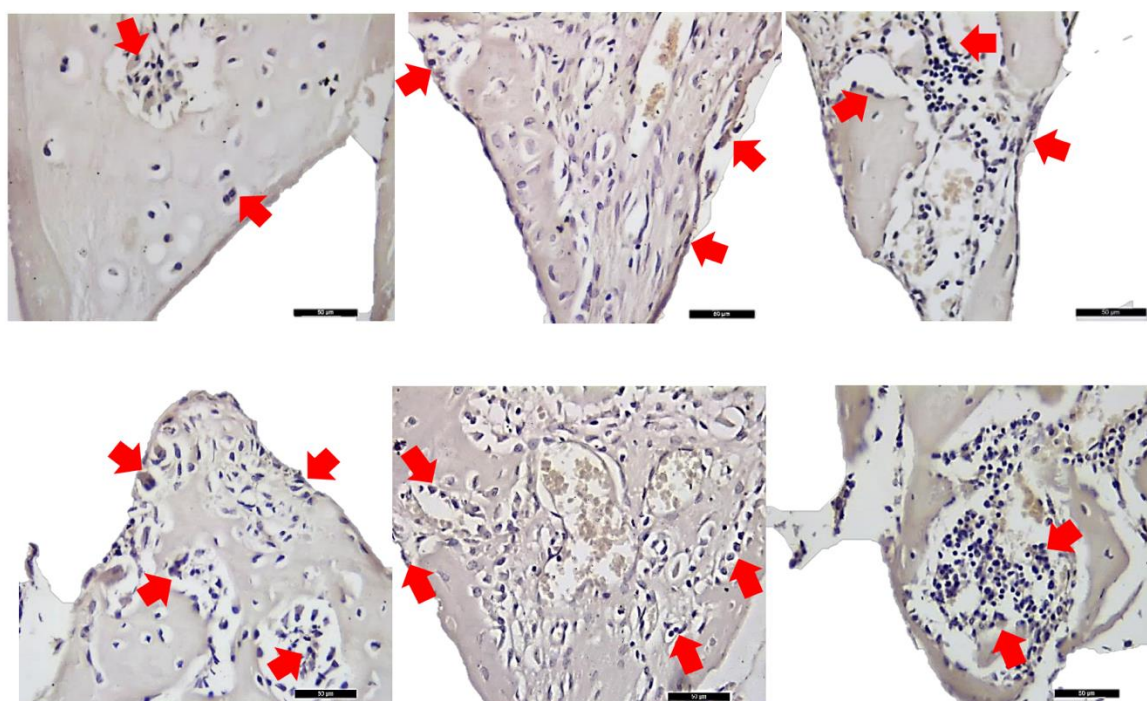


FIGURA 15 Padrão adotado: Imunomarcacão Leve 2 setas; Imunomarcacão Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcacão Moderada 4 setas; Grupo CRT aos 15 dias apresentou imunomarcacão leve **(A)**; Grupo CRT aos 30 dias apresentou imunomarcacão de leve a moderado **(B)**; Grupo CRT aos 40 dias apresentou imunomarcacão de leve a moderado **(C)**; Grupo RLX aos 15 dias apresentou imunomarcacão moderada **(D)**; Grupo RLX aos 30 dias apresentou imunomarcacão moderada **(E)**; Grupo RLX aos 40 dias apresentou imunomarcacão leve **(F)**.

Padrão Adotado para Imonomarcacão:

- ➡ ➡ Leve
 ➡ ➡ ➡ Leve á Moderado
 ➡ ➡ ➡ ➡ Moderado

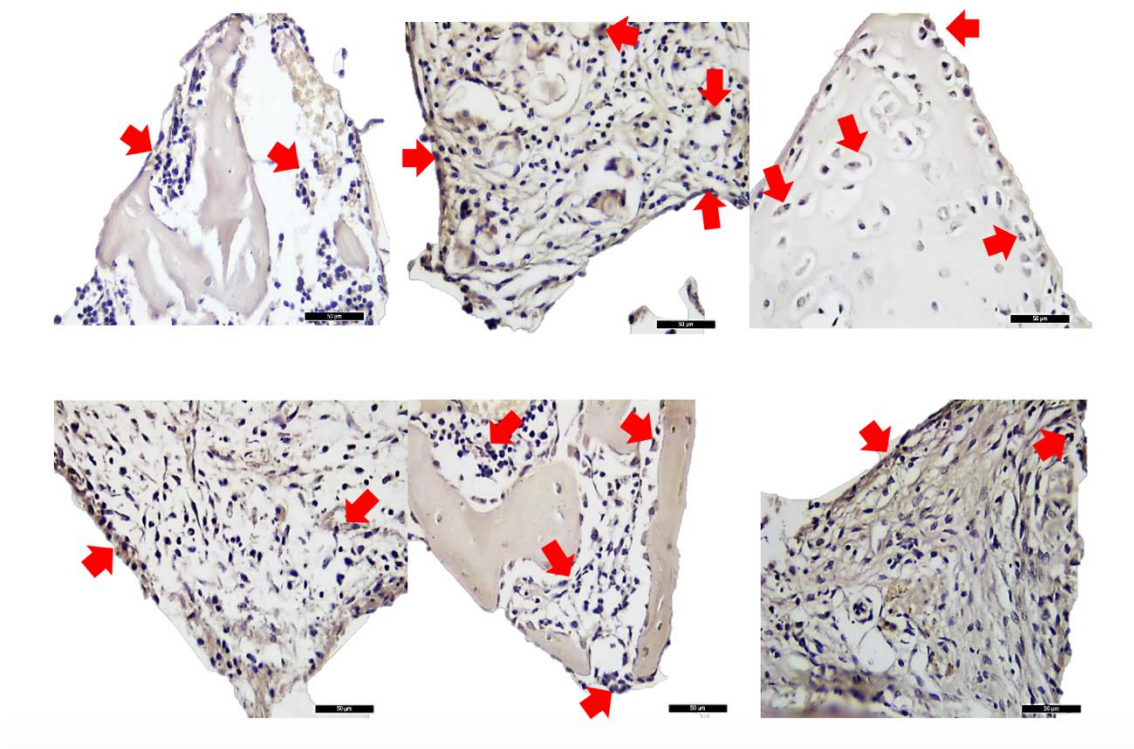


FIGURA 16 Padrão adotado: Imunomarcacão Leve 2 setas; Imunomarcacão Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcacão Moderada 4 setas; Grupo CRT aos 15 dias apresentou imunomarcacão leve **(A)**; Grupo CRT aos 30 dias apresentou imunomarcacão moderada **(B)**; Grupo CRT aos 40 dias apresentou imunomarcacão moderada imunomarcacão **(C)**; Grupo RLX aos 15 dias apresentou imunomarcacão leve **(D)**; Grupo RLX aos 30 dias apresentou imunomarcacão moderada **(E)**; Grupo RLX aos 40 dias apresentou imunomarcacão leve **(F)**.

Padrão Adotado para Imunomarcação:

→ → Leve
 → → → Leve á Moderado
 → → → → Moderado

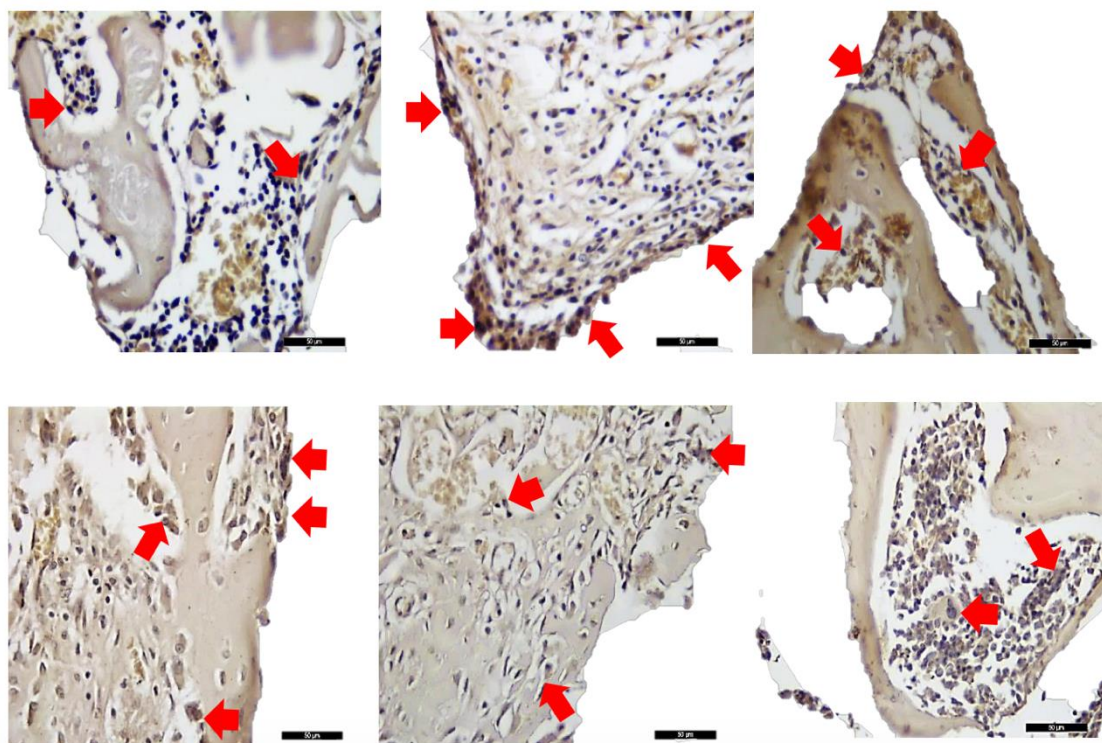
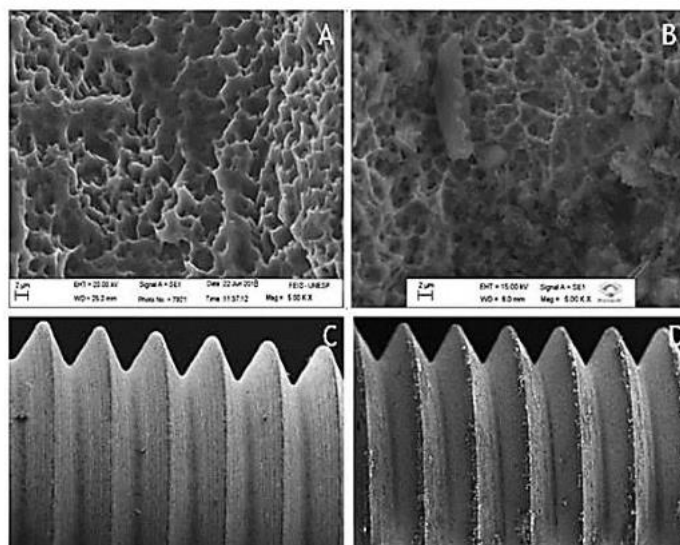


FIGURA 17 Padrão adotado: Imunomarcação Leve 2 setas; Imunomarcação Leve a Moderado 3 setas e Imunomarcação Moderada 4 setas; Grupo CRT aos 15 dias apresentou imunomarcação leve **(A)**; Grupo CRT aos 30 dias apresentou imunomarcação moderado **(B)**; Grupo CRT aos 40 dias apresentou imunomarcação de leve a moderado **(C)**; Grupo RLX aos 15 dias apresentou imunomarcação moderada **(D)**; Grupo RLX aos 30 dias apresentou imunomarcação leve a moderada **(E)**; Grupo RLX aos 40 dias apresentou imunomarcação e leve **(F)**.

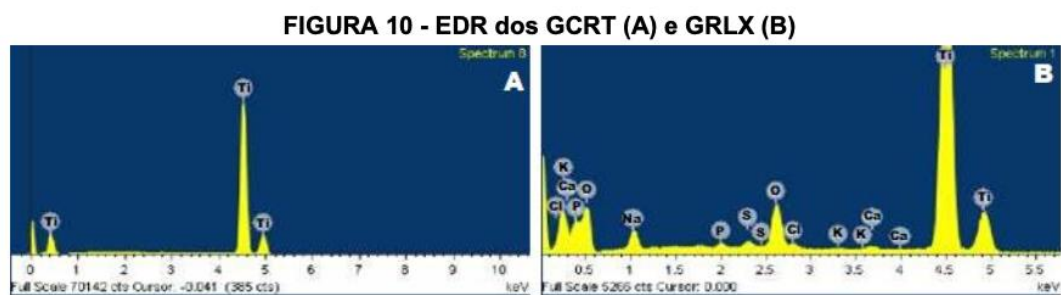
FIGURA 18 MEV do GCRT e GRLX



- A) Região cervical do implante do GCRT;
 B) Região cervical do implante do GRLX;
 C) Vista em maior aumento da região cervical do implante do GCRT;
 D) Vista em maior aumento da região cervical do implante do GRLX.

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2018)

FIGURA 19 EDR dos GCRT (A) e GRLX (B)



- Energia Dispersiva de Raios X com destaque aos elementos químicos:
 A) Encontrados na superfície do implante do GCRT; e
 B) Encontraods na superfície dos implantes do GRLX.

Fonte: Modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda (2018)

ANEXOS

**ANEXO A - Normas para publicação do periódico Clinical Implant
Dentistry and Related Research**

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/17088208/homepage/forauthors.html>

Anexo B – Comitê de Ética em Pesquisa em Animal



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 "Análise biomecânica, topográfica, histométrica e imunistoquímica da resposta óssea de uma superfície do implante revestida com raloxifeno", Processo FOA nº 2015-00612, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Dezembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Janeiro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Biochemical, topography, histometric and immunochemistry analysis of the bone response on implant surface treatment with raloxifeno", Protocol FOA nº 2015-00612, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 13, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 13, 2017.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora 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 - Via Mendonça - CEP 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@fua.unesp.br