

PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA

**Efeito do PTH tópico incrementado ao BioGran® no
defeito peri-implantar em ratos submetidos à
orquiectomia**

Araçatuba – SP

2020

PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA

**Efeito do PTH tópico incrementado ao BioGran® no
defeito peri-implantar em ratos submetidos à orquiectomia**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba — UNESP, para a
obtenção do Título de "DOUTOR EM
ODONTOLOGIA" (Área de concentração em
Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof^ª. Associada Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Adj. Paulo Noronha Lisboa
Filho

Coorientador: Prof. Associado Paulo Roberto
Botacin

Araçatuba – SP

2020

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

F383e Ferreira, Pedro Henrique Silva Gomes.
 Efeito do PTH tópico incrementado ao BioGran® no
 defeito peri-implantar em ratos submetidos à orquiectomia /
 Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira. - Araçatuba, 2020
 43 f. : il.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
 Coorientador: Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho
 Coorientador: Prof. Paulo Roberto Botacin

 1. Osteoporose 2. Regeneração óssea 3. Hormônio
 paratireóideo 4. Implantes dentários I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique Silva. **Efeito do PTH tópico incrementado ao BioGran® no defeito peri-implantar em ratos submetidos à orquiectomia.** 2020. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
9	19		Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do micro tomógrafo computadorizado (processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011).

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta conquista 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.**

Aos meus pais **Belino Gomes Ferreira e Alcione Silva Gomes Ferreira**, aqueles que me deram a vida, em todos os sentidos da palavra (me concederam e depositaram suas vidas em meu crescimento e desenvolvimento no homem que sou hoje), vocês são meus exemplos e minha fortaleza. Meus pais sempre me disseram: “quero que você estude e chegue o mais longe que você conseguir” espero que estejam orgulhosos dessa caminhada que pretendo nunca parar. Aos meus irmãos **Belino Gomes Ferreira Junior e Anna Paula Silva Gomes Ferreira**, pela cumplicidade, apoio e companheirismo por toda a minha trajetória, pela proteção e cuidado que tiveram comigo. Vocês que foram além de irmãos meus melhores amigos, confidentes e porto seguro. A minha irmã **Isabella Duarte Ferreira** pelo amor e carinho que me passa sempre que estamos juntos, o Pepe te ama muito. A minha afilhada **Helena Ferreira Borges**, por me mostrar um amor diferente do que já havia sentido, o amor agora não de quem é cuidado mas o de quem vai cuidar independente do que aconteça, eu serei como um segundo pai para você. E a minha companheira **Danila de Oliveira**, que esteve sempre presente comigo por toda essa caminhada, que compartilhou momentos bons, ruins, felizes e triste e nunca me deixou sozinho. Para todos vocês, eu estarei aqui de prontidão para o que for necessário, em pé e à ordem sempre. Obrigado por tornar mais fácil e feliz minha passagem por esta vida. Amo vocês...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, que no momento oportuno entrou com sua providência na minha vida. Transmitiu paz, e me fez rever algumas prioridades me transformando em uma pessoa melhor e mais humana, alimentou e fez possível a concretização de mais um sonho, guiando-me em todos os meus caminhos. Creio que a cada procedimento realizado por minhas mãos, a dele sempre estará presente.

A **minha querida orientadora, Profa. Roberta Okamoto**, à qual sou eternamente grato pela oportunidade da convivência, por aceitar mais esse desafio que foi o doutorado, por enfrentar todas as batalhas e as barreiras que nos foram colocadas em nossa frente. Assim como no mestrado, continuo me espelhando na senhora, sua serenidade, senso de justiça, forma de ensino. Agora professora, começo a entender o qual complicado são decisões que pareciam simples no passado, o quão complicado é orientar e ser entendida por todos, o trabalho que a senhora faz com todos nós Pós-Graduandos é como uma orquestra, e sem sombra de dúvidas a senhora é a melhor de todas as maestrinas. Obrigado pelo apoio, compreensão, auxílio, disponibilidade, carinho, acolhimento, confiança e amizade, tenho a senhora como a minha Mãe na ciência. Serei eternamente grato, pois tudo nessa vida pode ser levado de nós, mas o conhecimento que a senhora me proporciona, ninguém nunca tirará de mim. Conte sempre comigo, eu sempre estarei aqui em pé e a ordem para o que a senhora precisar.

Ao **Prof. Paulo Roberto Botacin, meu co-orientador e amigo**. Obrigado pela disponibilidade, pelos ensinamentos e oportunidades, por sempre me mostrar como podemos melhorar mesmo que nas pequenas coisas, por compartilhar sua forma de ensinar. Uma grande qualidade do senhor professor dentro do departamento, é a facilidade que tem de tratar-nos como iguais você faz o departamento parecer nosso lar. Gosto e admiro muito o senhor. Muito Obrigado professor!

Ao **meu co-orientador Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho**. Meu muito obrigado primeiramente professor por acreditar e me apoiar em todos os pontos deste

trabalho que foram novos para mim, em cada técnica que me ensinou, cada tempo disponibilizado, todo conhecimento compartilhado de uma área que eu era completamente leigo. Obrigado pelas conversas e por ser essa pessoa incrível pelo tratamento que tive de igual para igual, levarei esses ensinamentos para o resto da minha vida tanto profissional quanto como pessoa, aprendi muito com o senhor.

Ao Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Serenidade, humildade e paciência são características marcantes do senhor, o que te faz um ser humano especial. Aprendo com o senhor sempre, nos procedimentos cirúrgicos, em uma conversa, em um olhar, em um silêncio. Jamais esquecerei de tudo que o senhor fez por mim, começando pela confiar a ponto de representar o seu nome em um curso, ainda em meu primeiro ano de mestrado, essa experiência que me proporcionou será inesquecível, ficou marcada e com toda certeza ficará gravada para sempre em minha memória. O senhor sabe mais do que ninguém, que sem sua ajuda a presente pesquisa não teria acontecido, obrigado por simplesmente em alguns minutos de conversa de Centro Cirúrgico o senhor resolver um dos maiores problemas que tínhamos, disponibilizando todo biomaterial necessário para a realização da presente pesquisa. Sempre vou aprender com o senhor, me tornando a cada dia um melhor cirurgião e melhor pessoa. Muito Obrigado.

A Professora Cristine Miron Stefani, por ter acreditado em mim ainda na graduação, período no qual me orientou em minha primeira bolsa de iniciação científica e além disso foi minha orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso, tive sempre como uma inspiração de dedicação, bondade e competência. Você foi a primeira pessoa a me explicar como a escrita deveria ser estruturada, o que usar ou não em um trabalho, além de ser uma professora incrível na clínica odontológica. Agradeço por toda confiança em mim depositada e além de tudo agradeço à Deus por ter colocado a senhora no meu caminho profissional. Muito Obrigado Professora.

Ao Professor Eduardo Passos Rocha, o qual nos ensina em uma simples forma de falar, ou de mostrar a forma correta de se fazer algo. Admiro o senhor por tudo que conquistou com sua competência, intelecto e comprometimento com tudo que faz. Sou um grande admirador seu professor. Conte sempre comigo para o que precisar, estarei sempre aqui em pé e à ordem. Obrigado por tudo.

Ao Professor Gustavo Mendonça e Professora Daniela Baccelli Mendonça, meus sinceros muito obrigado, pois foi na primeira aula que assisti de vocês que me

inspirei a querer ir além, almejei ainda mais um estágio no exterior e essa vontade veio tomando força até que enfim consegui. Por uma ironia do destino, de todos os lugares do mundo que eu poderia ir acabei indo para Hamilton, ON, Canadá, cidade a alguns quilômetros de distancia de Ann Arbor, MI, USA. E pude visita-los e ampliar ainda mais meu conhecimento quando conheci os famosos laboratórios da University of Michigan. Obrigado por terem feitos os meus dias ai incríveis e por todo apoio e auxilio que sempre me deram quando precisei. Serei sempre grato!

Ao professor Clovis Marzola “*In memoriam*”, você que será meu eterno professor e amigo. Sempre levarei seus ensinamentos para minha vida. Gostaria que o senhor pudesse ver na pessoa e profissional que estou me tornando, pois ainda tenho muito o que aprender. Eu acredito que trilharei minha vida como a do senhor, incessantemente buscando aprendizado e compartilhando tudo que aprendo, pois acredito fielmente que o dia em que pensar não haver mais nada a aprender, já poderei morrer. Meus mais sinceros e profundos agradecimentos, muito obrigado!

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Prof. Francisley Ávila Campos, mais do que um professor um amigo que espero levar para o resto da vida, verdadeiro, divertido e muito responsável, tive semanas incríveis de plantão sob sua supervisão, meus sinceros agradecimento professor, o mundo precisa de mais pessoas com um coração como o do senhor. **Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, pela disponibilidade, dedicação, por ser verdadeira em tudo que faz e sempre pensar no próximo. Muito Obrigado por tudo, sou um grande admirador da senhora. **Prof. Osvaldo Magro Filho, Prof. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Daniela Ponzoni e Prof Leonardo Faverani**. Meu muito obrigado por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados no departamento. Vocês têm a minha admiração.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara, por fornecer todo suporte para o desenvolvimento da minha pesquisa, assim como o a estrutura da universidade (FOA-UNESP)

Ao meu amigo do peito Prof. Fernando Isquierdo de Souza, de fato em palavras fica difícil descrever a admiração e carinho que tenho por você, meu amigo. Sempre ao meu lado, sempre me escutando e, muitas vezes, a pessoa quem me

aconselha. Meu amigo, irmão é Saiba que sou um grande admirador do seu trabalho e do seu caráter, muito obrigado por fazer parte da minha história!

Ao meu amigo de longas datas Erik Neiva, que sempre teve ao meu lado desde o início da minha introdução à cirurgia, durante a Residência em CTBMF na cidade de Bauru. Você que mais do que um amigo é um irmão, que muito me ensina com os conselhos e apoio. Mesmo que a vida reserve caminhos diferentes para nosso futuro, você sempre terá as portas abertas em minha vida e na minha casa. Muito obrigado meu irmão.

Ao meu grande amigo Fábio Roberto de Souza Batista, aquele que sempre estive ao meu lado e foi meu parceiro em todas as empreitadas científicas, além de muito me aconselhou. Você é uma pessoa boa de coração, esse é um dos vários motivos que vou te levar como amigo pelo resto da minha vida. Aprendo com você sempre meu “*brother*”, obrigado por todos esse tempo, pela amizade e pela sua coragem em querer mudar as coisas, fazendo com que aconteçam, o primeiro passo dado para estarmos juntos no laboratório com nossa equipe e orientadora foi dado por você. Obrigado por tudo meu amigo.

Ao meu amigo **Gabriel Mulinari**, obrigado por todo apoio e suporte diariamente em nosso laboratório meu amigo, conte sempre comigo!

As amigas e companheiras do nosso grupo de pesquisa, **Letícia Pitol Palin, Ana Cláudia Ervolino da Silva, Naara Gabriela Monteiro, Jaqueline Suemi Hassumi**. Vocês são a alma e o futuro do nosso grupo. Dedicção, amizade, companheirismo e vontade de cada dia serem melhores, compartilho cada uma dessas qualidades e por isso nos demos tão bem por esse longos 5 anos, os quais parecem que ter começado ontem, não é? Obrigado por terem feito minha estadia aqui a melhor possível.

As Alunas(o) de Iniciação Científica da nossa equipe, **Carolina Sayuri Wajima, Juliana de Moura, Jaqueline Silva Santos, Helena Gonçalves, Ana Carolina dos Passos, Tatiany Aparecida de Castro, Odir Nunes de Oliveira Filho** pela disponibilidade, amizade, auxílio, boa vontade e por ter tornado toda a parte da execução do trabalho mais fácil e agradável, meu muito obrigado. Em especial a **Paula Buzo Frigério**, pelo auxílio e campanha em todos os passos referente aos

procedimentos realizados em meu mestrado e doutorado, fomos parceiros e trabalhamos muito tempo juntos, obrigado por toda ajuda Paulinha.

Grandfield Research Group (GRG). First of all my supervisor **Dr^a. Kathryn Grandfield**, who provided me with teaching and training to develop analysis that I had never seen and that I never thought I would be able to understand and apply. In addition to allowing me to participate in everything and actually be part of her Research Group as an effective member. I was able only with simple observations of her activities as an advisor to learn how to act objectively and effectively. I had an incredible experience because I felt at home for the period that I was at McMaster University, to you who helped me so much and believed in me, my most sincere thanks!

Chiara Micheletti, you were my partner and helped me with everything related to the analyzes developed at McMaster University, thank you for all your understanding, help and dedication to this work, without you it would certainly not be possible. You are an example of dedication and commitment, I learned a lot in each conversation and each class about the analysis developed that I had given, I am sure that your future will be bright. My most sincere thanks and I hope that our path crosses in congresses or future works.

Dakota Binkley, you that without a doubt is the heart of the GRG, always thinking and helping everyone, you are the link that unites each one within the group and gives that face of home or family to the team. Thank you for the affection, friendship and all the help. You're the best!

Joe Deering, thanks for the help in the work we developed together, for believing in the ideas we had and taking responsibility for making techniques different from the usual ones that were already developed in the laboratory. For the conversations about FIB and dental implants and for helping whenever I needed it. Thanks for everything!

Liza-Anastazia DiCecco, for her affection, friendship, companionship and high spirits, always available whenever I needed to. Thanks for everything Liza.

Bryan Lee, even though we may spend our time together within the group, once you defended your doctorate in the middle of my time at McMaster, the knowledge

gained from seeing you during your presentations and during our conversations was enriching. Thank you!

To **Jacky Winitsky, Kierdra Dowling and Ariana Hurley**, for all the help, friendliness and companionship whenever I needed it, you are fantastic and certainly have a promising future. Thank you for all the help you gave me.

Aos alunos da graduação, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado, auxiliando no meu desenvolvimento para Docência.

CAPES

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

FAPESP

Processo nº 2017/08187-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela viabilização das análises por microscopia confocal a laser.

Ao Canadian Center for Electron Microscopy (CCEM), McMaster, pela viabilização das análises por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, Focused Ion Beam (FIB) e Tomografia de elétrons.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor pela oportunidade de realização do curso de Doutorado. A cada dia admiro mais esta universidade e agradeço ainda as oportunidades que esta casa me forneceu e continua fornecendo.

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

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

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

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada. Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação de Odontologia, da área de Prótese; Periodontia; Ortodontia; da Periodontia; da Clínica Integrada; da Dentística; da Estomatologia e Odontopediatria. Meu muito Obrigado

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Todos vocês têm minha admiração, amizade e carinho. Muito obrigado por cada conhecimento compartilhado, ajuda e momentos incríveis que passamos. Levo vocês no meu coração.

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente.

“O dia em que nada aprendi, foi um dia não vivido”

Leonardo da Vinci

Gomes-Ferreira PHS. Efeito do PTH tópico incrementado ao BioGran® no defeito peri-implantar em ratos submetidos à orquiectomia [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o PTH 1-34 em via tópico, funcionalizado ao BioGran® pela técnica da sonoquímica, nos defeitos peri-implantares em ratos submetidos à orquiectomia. **Materiais e Métodos:** 128 ratos foram divididos em 2 grupos: SHAM - cirurgia fictícia, ORQ - orquiectomia, os quais cada grupo destes foram subdivididos em 3 grupos CLOT (defeito peri-implantar, sem utilização de biomaterial); BG (defeito peri-implantar + utilização do BioGran®); BGPTH (defeito peri-implantar + BioGran® funcionalizado com PTH 1-34 tópica). Cada animal recebeu um implante na metáfise tibial. Aos 14 e 42 dias de pós-operatório, foram administrados os fluorocromos calceína e alizarina, respectivamente. A eutanásia ocorreu ao 30º (análises ultraestrutural e EDX) e 60º dia (demais análises) após a instalação dos implantes. As peças foram analisadas pela imunoistoquímica (WNT, Beta Catenina, TRAP e OC), HE e RT-PCR (RUNX2, ALP e OC), além da análise biomecânica, microtomografia computadorizada (microCT) para avaliação dos parâmetros de percentual de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado (Tb.Th), número e separação de trabéculas (Tb.N, Tb.Sp) e percentual de porosidade total, (Po-tot) e Bone Implant Contact (BIC, pela i.S). Para microscopia confocal a laser, a mensuração da área dos fluorocromos, da taxa diária de aposição mineral (MAR), e área de osso neoformado (AON) e análise Elementar (EDX). A nível ultraestrutural foram realizadas as análises de MET. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis e paramétricos pelo teste ANOVA 1 ou 2 fatores. Como pós-teste, os testes de Holm-Sidak, ou Tukey foram aplicados, com nível de significância a 5%. **Resultados:** Para os parâmetros microtomográficos referente a volume e qualidade (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N) o bio material mostrou melhora em todos os grupos aplicados com ou sem PTH 1-34, já para BIC foi possível notar que o grupo ORQ-BGPH foi semelhante ao SHAM-BG ($p>0,05$). Para AON e análise dos fluorocromos o biomaterial funcionalizado elevou a regeneração óssea local do animal orquiectomizado ao mesmo nível do animal saudável em que foi utilizado biomaterial com ou sem PTH 1-34. **Conclusões:** A funcionalização do BioGran® com PTH 1-34 apresenta melhora na regeneração óssea dos animais, sendo ainda mais eficaz nos animais submetidos a osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose. Regeneração Óssea. Hormônio Paratireóideo. Implantes Dentários.

Gomes-Ferreira PHS. Effect of topical PTH added to BioGran® on peri-implant defect in rats submitted to orchiectomy [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2020.

ABSTRACT

Objective: To evaluate PTH 1-34 in a topical way, functionalized to BioGran® by the sonochemistry technique, in peri-implant defects in rats submitted to orchiectomy. **Materials and Methods:** 128 rats were divided into 2 groups: SHAM - fictitious surgery, ORQ - orchiectomy, which each group was subdivided into 3 CLOT groups (peri-implant defect, without biomaterial); BG (peri-implant defect + BioGran®); BGPTH (peri-implant defect + BioGran® functionalized with PTH 1-34). Each animal received an implant in the tibial metaphysis. At 14 and 42 days after surgery, calcein and alizarin fluorochromes were administered, respectively. Euthanasia occurred at the 30th (ultrastructural and EDX analysis) and 60th day (other analyzes) after the implant installation. The samples were analyzed by immunohistochemistry (WNT, Beta Catenin, TRAP and OC), HE and RT-PCR (RUNX2, ALP and OC), in addition to biomechanical analysis, microCT for evaluation of bone volume percentage parameters (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number and separation of trabeculae (Tb.N, Tb.Sp) and percentage of total porosity, (Po-tot) and Bone Implant Contact (BIC, by iS). For laser confocal microscopy, the measurement of the fluorochrome area, the mineral apposition rate (MAR), and the area of neoformed bone area (NBA) and elemental analysis (EDX). At the ultrastructural analysis, MET analyzes were performed. Nonparametric data were compared using the Kruskal-Wallis test and parametric data using the one and two- way ANOVA test. As a post-test, the Holm-Sidak or Tukey tests were applied, with a significance level of 5%. **Results:** For the microtomographic parameters referring to volume and quality (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp and Tb.N) the bio material showed improvement in all groups applied with or without PTH 1-34, for BIC it was possible to notice that the ORQ-BGPH group was similar to the SHAM-BG ($p > 0.05$). For NBA and analysis of fluorochromes, the functionalized biomaterial increased the local bone regeneration of the orchiectomized animal to the same level as the healthy animal in which biomaterial was used with or without PTH 1-34. **Conclusions:** The functionalization of BioGran® with PTH 1-34 shows improvement in bone regeneration in animals, being even more effective in animals submitted to osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis. Bone Regeneration. Parathyroid Hormone. Dental Implants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Homogeneização do BioGan® com a Teriparatida por meio do processo de sonoquímica para obtenção do biomaterial utilizado na presente pesquisa.....	54
FIGURA 2A - Imagem MEV retroespalhada da partícula de biomaterial e osso; B Mapeamento do local predefinido pela sobreposição de todos elementos isolado em que a cor laranja simboliza presença de P e Ca, e azul ao centro Si; C Para o mapeamento de Fósforo na partícula do biomaterial e osso adjacente foi utilizado a cor vermelha; D Mapeamento isolado de Cálcio utilizando a cor amarela; E Mapeamento de Sílica utilizando a cor Azul.....	54
FIGURA 3A - Imagem MEV retroespalhada do biomaterial (BG) e osso; B MET pelo FIB, incluindo trincheiras cortadas em ambos os lados da área de interesse, protegidas por deposição de tungstênio; C levantamento da amostra; D conexão à grade MET; E afinamento da amostra; F HAADF STEM imagem da amostra final mostrando osso e biomaterial (BG).....	55
FIGURA 4 – Imagens histológicas do reparo peri-implantar do animais referentes aos grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BGPTH (objetiva, 10X e 20X).....	55
FIGURA 5 – Imunoistoquímica utilizando as proteínas WNT, Beta Catenina, ALP, TRAP e OC no período de 60 dias. Imunomarcações dos grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BGPTH. (Objetiva, 20X).....	56
FIGURA 6 – Expressão genética relativa de RUNX2 (A), ALP (B), e OC (C) no período de 60 dias no grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).....	57
FIGURA 7 – Resultado do torque reverso dos grupos ORQ e SHAM, avaliação da comparação dos grupos preenchidos com Coágulo, BioGran® e BioGran® PTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).....	57
FIGURA 8 – Quantificação do percentual de volume ósseo para SHAM e ORQ, na comparação dos grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferente = $p < 0,05$).....	58
FIGURA 9 – Quantificação da espessura trabecular. Valores aproximados para SHAM e ORQ - COAG, BG e BGPTH (Tukey, $p > 0,05$).....	58
FIGURA 10 – Quantificação da separação das trabéculas. Valor maior para SHAM e ORQ CLOT e menor para SHAM e ORQ BG e BGPTH (para todas comparações, $p > 0,05$).....	59
FIGURA 11 – Quantificação do número de trabécula. Valor menores para SHAM e ORQ CLOT e maiores para SHAM e ORQ BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).....	59
FIGURA 12 – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para os grupos ORQ e SHAM CLOT e menos poroso para ORQ e SHAM BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).....	60

FIGURA 13 – Quantificação a extensão linear de contato osso/implante (BIC). Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p<0,05$).....	60
FIGURA 14 – Renderização tridimensional do osso formado entorno das espiras nos diferentes grupos experimentais realizado através da microtomografia 3D.....	61
FIGURA 15 – Marcação de calceína (verde) e alizarina (vermelho) das linhas fluorescentes na matriz de cálcio, demonstrando a dinâmica do osso peri-implantar do grupos experimentais.....	61
FIGURA 16 – Quantificação dos fluorocromos calceína (verde) e alizarina (vermelho). Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p<0,05$).....	62
FIGURA 17 – Valores referentes a taxa de aposição mineral óssea diária. Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p<0,05$).....	62
FIGURA 18 – Valores referentes a área óssea neoformada. Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p<0,05$).....	63
FIGURA 19 – A e B: Representação elementar do biomaterial dos grupos SHAM BG e BGPTH com predominância de sílica no interior da partícula e Ca e P na extremidade (fina camada); B e D: análise linear da partícula de biomaterial com predominância de Si em maior extensão e contagem.....	63
FIGURA 20 – A e B: Representação elementar do biomaterial dos grupos ORQ BG e BGPTH com quantidades similares de Si; Ca e P; B e D: análise linear da partícula de biomaterial com maior extensão de Ca e P, e contagem de Si maior no grupo BG em comparação a CA e P, porém semelhante no grupo BGPTH.....	64
FIGURA 21 – Amostras do grupo SHAM BG; A: ao remover do FIB; B, C e D: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- BioGran®; Bone – Osso; * - Região em condição de neoformação óssea.....	65
FIGURA 22 – Amostras do grupo SHAM BGPTH; A: ao remover do FIB; B, C e D: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- BioGran®; Bone – Osso.....	66
FIGURA 23 – Amostras do grupo ORQ BG; A: ao remover do FIB; B, C e D: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- BioGran®; Bone – Osso.....	67
FIGURA 24 – Amostras do grupo ORQ BGPTH; A: ao remover do FIB; B, C, D, E e F: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- BioGran®; Bone – Osso; * - Região em condição de neoformação óssea.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos experimentais de acordo com o experimento e teste do biomaterial.....52

TABELA 2 - Distribuição dos grupos experimentais, mediante as análises de tecido calcificado e descalcificado, microCT, Biomecânica, RT-PCR e análise ultraestrutural da interface osso/biomaterial.....52

TABELA 3 - Scores obtido nas imunomarcações das proteínas WNT, Beta Catenina, osteocalcin, and TRAP nos diferente grupos experimentais.....53

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/kg/dia - Micrograma por quilograma por dia

µm - Micrômetro

µm² - Micrômetro quadrado

Al - Alumínio

BV - Volume ósseo

BV/TV - Percentual de volume ósseo

Cu - Cobre

g - Grama

Kv - Quilovolt

Micro CT - Microtomografia Computadorizada

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mm³ - Milímetros cúbicos

N – Newton

N.cm - Newton por centímetro

nº – Número

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

Po-tot - Percentual de porosidade total

PTH - Paratormônio

Rpm - Rotações por minuto

Tb.N - Número de trabéculas

Tb.Sp - Separação entre as trabéculas

Tb.Th - Espessura trabecular

vs - versus

µA – Microampére

W - Watt

W/cm² - Watt por centímetro quadrado

kHz - Quilohertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Animais	21
2.2 Biomaterial	21
2.3 Medicamento	22
2.4 Sonoquímica - Funcionalização do BioGran® com PTH 1-34	22
2.5 Cirurgias Animal	23
2.5.1 Orquiectomia bilateral	23
2.5.2 Cirurgia de confecção do defeito peri-implantar e instalação dos implantes	23
2.6 Análise Biomecânica	25
2.7 RT-PCR	26
2.8 Análise Imunoistoquímica	26
2.9 2.8 Análise Histológica	27
2.10 Análise de Micro-CT	28
2.11 Preparo e análise dos tecidos calcificados	28
2.12 Microscopia Confocal à Laser	29
2.13 Análise Elementar e Ultraestrutural	29
2.13.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
2.13.2 Análise elementar dispersão de energia de raios-X (Elemental analysis by energy dispersive X-ray -EDX)	31
2.13.3 Microscopia de feixe de íons focado (Focused Ion Beam Microscopy -FIB)	31
2.13.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	32
2.13.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF)	33
2.14 Análise Estatística	33
3 RESULTADOS	34
3.1 Análise Histológica	34
3.2 Imunoistoquímica	35
3.3 RT-PCR	36
3.4 Análise Biomecânica	37
3.5 Micro-CT	37
3.6 Microscopia Confocal à Laser	39
3.7 Análises Elementar e Ultraestrutural	40
3.7.1 Análise elementar dispersão de energia de raios-X (Elemental analysis by energy dispersive X-ray -EDX)	40
3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF)	41
4 DISCUSSÃO	43
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A instalação de implantes osseointegrados em alvéolos após a extração dental imediata, ou ainda, em áreas de qualidade e quantidade óssea deficientes como deiscências, fenestrações, defeitos verticais e peri-implantares, constituem a grande parcela das condições clínicas encontradas no momento da avaliação e reabilitação oral do paciente (STENTZ *et al.*, 1997). Diante destas situações, houve a necessidade de avanços no campo das reconstruções, no sentido de preparar ou otimizar o leito receptor através de enxertos autógenos, xenógenos ou aloplásticos (DAVIES, 2003).

Dentre os materiais aloplásticos utilizados, uma das opções é o BioGran® (Biomet 3i, Palm Beach Gardens, Flórida, USA), material a base de Sílica, seus grânulos atuam como carreadores para fatores de crescimento ou na promoção de células de formação óssea (SCHEPERS *et al.*, 1991; SCHEPERS *et al.*, 1993). Os vidros bioativos têm se destacado como osteocondutores, são materiais com propriedades superiores à hidroxiapatita e validados pela interação da interface entre a superfície do implante e os tecidos adjacentes (CHAN *et al.*, 2002; MISCH; DIETSH, 1993). Além disso, foi demonstrado serem de fácil manipulação, atuarem como hemostático, além de mais estáveis em um local de sangramento do que a hidroxiapatita. Apresentam característica peculiar pela sílica em sua composição, tornando-os altamente bioativo (FURUSAWA; MIZUNUMA, 1997).

Além da quantidade, a qualidade do tecido ósseo é fator determinante para a adequada integração do implante dentário (ISIDOR, 2006; LEUNG *et al.*, 2001; TABATA *et al.*, 2011). Neste contexto, quando o osso adquire uma estrutura cortical e/ou trabecular com menor densidade, a interface osso/implante é comprometida (DRAGE *et al.*, 2007; SHAPURIAN *et al.*, 2006), podendo ser observado nos quadros de osteoporose (OZAWA *et al.*, 2002; YAMAZAKI *et al.*, 1999).

Esta desordem do metabolismo ósseo é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa, atingindo aproximadamente 2/3 desta população (DRAKE; KHOSLA, 2012; KHOSLA; AMIN; ORWOLL, 2008). Entretanto, também é relatada nos homens, com maior incidência nos indivíduos acima de 50 anos de idade

(DRAKE; KHOSLA, 2012; GIUSTI; BIANCHI, 2015; KHOSLA; AMIN; ORWOLL, 2008).

Medicamentos a base de PTH, 1-34 é indicado para osteoporoses graves, por ser um agente anabolizante do tecido ósseo que aumenta a densidade mineral óssea (NIIMI *et al.*, 2015). Este medicamento é uma opção eficaz para tratamento de osteoporose em homens (FARAHMAND; SPIEGEL; RINGE, 2016; NIIMI *et al.*, 2015).

Estudos clínicos realizados em homens osteoporóticos mostram que o PTH 1-34 é eficaz no tratamento da osteoporose, prevenindo fraturas vertebrais e de ossos longos (FINKELSTEIN *et al.*, 2003). A utilização de PTH 1-34 tópica por diferentes métodos vem sendo testada diretamente no titânio (GULATI *et al.*, 2016), mostrando resultados em que foi liberado PTH local suficiente para influenciar com eficácia a expressão do gene osteoblástico/osteocítico, o que sugere a potencial eficácia da libertação localizada do PTH (GULATI *et al.*, 2016).

Tendo em vista que a utilização sistêmica do PTH 1-34 já foi descrita na literatura e testada na regeneração peri-implantar e no reparo ósseo alveolar em ratos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA PUTTINI *et al.*, 2019; GOMES-FERREIRA *et al.*, 2020), com resultado positivo na formação óssea e melhora na qualidade reparacional, este trabalho tem como objetivo avaliar o PTH 1-34 em via tópico, funcionalizado ao BioGran® pela técnica da sonoquímica, nos defeitos peri-implantares em ratos submetidos à orquiectomia, através de análises em tecido calcificado e descalcificado, além da avaliação ultraestrutural em nanoescala da interface osso/biomaterial formada no processo reparacional.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, o qual obteve o parecer favorável (Nº 00199/2017) (**Anexo A**), cento e vinte e oito (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso médio de 500 gramas provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, foram alocados aleatoriamente. Os ratos foram divididos em dois grupos (SHAM, ORQ), conforme a cirurgia de indução da osteoporose. Em que os animais SHAM foram submetidos à cirurgia fictícia, somente com exposição dos testículos, e os animais ORQ foram submetidos à orquiectomia bilateral.

Foi realizada a avaliação do grupo ORQ e SHAM relacionada ao reparo ósseo nos defeitos peri-implantares. Para isso os grupos ORQ e SHAM foram dividido em três diferentes subgrupos CLOT (grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado implante sem utilização de biomaterial - coágulo); BG (grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado implante associado ao enxerto, utilização do BioGran®); BGPTH (grupo em que foi criado o defeito peri-implantar e instalado implante e enxerto, utilização do BioGran® associado ao PTH 1-34 tópica) (**Tabela 1 e 2**).

Inicialmente os animais de todos os grupos, foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*.

2.2 Biomaterial

BioGran® é um material aloplástico composto por vidro bioativo com tamanho de partícula de aproximadamente 300 a 355 µm (Biomet 3i, Palm Beach Gardens, Flórida, USA). Material eleito por apresentar bons resultados na osseointegração de implantes, com neoformação óssea circundante em defeitos peri-implantares (VEIS *et al.*, 2006), além disto, apresenta facilidade na redução e homogeneização por suas características físicas e estruturais através da técnica de sonoquímica que foi utilizada.

2.3 Medicamento

O PTH 1-34 é um análogo ao paratormônio, apresenta-se como agente anabolizante do tecido ósseo que aumenta a densidade mineral óssea diretamente por ativar os osteoblastos, fazendo com que a aposição de osso novo seja maior do que de osso velho. Foi utilizado o PTH 1-34 da marca Eli Lilly, denominado Forteo® (Forteo, Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, EUA), o qual apresenta-se em forma líquida em concentração de 250µg/ml em uma caneta injetora com cartucho de 3 ml, passível a mistura de forma homogênea ao BioGran®.

2.4 Sonoquímica - Funcionalização do BioGran® com PTH 1-34

A mistura e homogeneização foi realizada no laboratório de materiais avançados do Centro para Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais Funcionais - Divisão de Saúde – FAPESP (Pesquisador: Paulo Noronha Lisboa Filho). As amostras foram tratadas por sonoquímica utilizando o BioGran® e o PTH 1-34 com água Milli-Q® ultrapura como meio para obter uma humidade homogênea e para diminuir o tamanho da partícula da cerâmica. A água Milli-Q® ultrapura faz com que as bolhas de cavitação tenham maior vapor de soluto e, assim, acelere o efeito da cavitação acústica. Utilizando a metodologia descrita por Gomes-Ferreira *et al.*, 2019, as amostras foram submetidas juntas ao processamento ultra-sônico em um modelo de marca Sonics VCX-750, 750 W de potência e frequência de 20 kHz, com pulsos de 5 min (realizados por 3 vezes, totalizando 15 minutos de sonoquímica) (GOMES-FERREIRA *et al.*, 2019) e amplitude variável fixada até 40% da amplitude nominal do Equipamento (450 W/cm²). Na câmara de síntese, as condições foram ar atmosférico, o recipiente com as amostras e a ponta ultra-sônica, os quais foram arrefecidos com um banho de gelo. Quando a teriparatida foi adicionada na sonoquímica, as amostras foram marcadas como BGPTH e foram subsequentemente secas num forno a 60°C, e não foi efetuado mais tratamento de recozimento térmico (ARRUDA; ORLANDI; LISBOA-FILHO, 2013; LISBOA-FILHO *et al.*, 2018; GOMES-FERREIRA *et al.*, 2019). O grupo controle (BG) foi constituído de BioGran® puro processado por sonoquímica em água Mili-Q® (**Figura 1**).

2.5 Cirurgias Animal

2.5.1 Orquiectomia bilateral

Os ratos do grupo ORQ foram anestesiados com Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda) e Vetaset (Cloridrato de Quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) e, a seguir, foram realizadas incisões em ambos os sacos escrotais, com a exposição dos testículos. Com a pinça hemostática o funículo espermático foi apresentado, com concomitante individualização e laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular, e então seccionados. O testículo foi removido e a ferida cirúrgica suturada com fio de poliglactina 910 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Os ratos do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos testículos sem sua remoção, com intuito de submeter os animais deste grupo ao mesmo estresse cirúrgico do outro grupo (ORQ) (AL-SHAHAT *et al.*, 2011). Os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

2.5.2 Cirurgia de defeito peri-implantar e instalação dos implantes

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

Após a sedação dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole divulsionado em espessura

total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Foram instalados 224 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido, com diâmetro de 2mm e altura de 4mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3mm de diâmetro nas duas corticais, e broca lança, 2,0mm, piloto (2/3) e 3,0mm na cortical superior e medular das tíbias, montadas em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany). Os defeitos do **grupo COAG**, foram preenchidos apenas com coágulo e o implante inserido imediatamente, os quais obtiveram travamento apenas na cortical inferior e na cortical superior ficaram livres de contato com osso. Nos defeitos criados no **grupo BG**, o preenchimento foi feito com o BioGran® sonificado (15 min) e o implante inserido imediatamente. No **grupo BGPTH**, o preenchimento dos defeitos foi realizado com o BioGran® funcionalizado com PTH 1-34 (pela técnica de sonoquímica, com tempo de 15min) e o implante inserido imediatamente. O volume de material usado para o preenchimento dos defeitos no grupo BG e BGPTH, foi referente ao defeito criado pela fresa de 3mm de diâmetro por 4mm de profundidade (volume = 28,27mm³) subtraída pelo volume do implante de 2mm x 4mm (volume = 12,57mm³), totalizando 15,70mm³ que foram utilizados de biomaterial, para que assim haja contato do enxerto com o implante por toda sua extensão. Para o cálculo do volume, foi utilizada a fórmula: $V = \pi \cdot r^2 \cdot a$ (volume é igual à Pi vezes raio ao quadrado vezes altura).

Para o grupo BGPTH, a concentração relativa em massa de PTH e BioGran® foi determinada seguindo o padrão descrito por Tao *et al.*, em 2018, o qual usou 1 µg de teriparatida (PTH 1-34) para o volume de 35,34 mm³, referente a um defeito criado em fêmur de ratos. Levando em conta que o defeito a ser preenchido com biomaterial no nosso estudo é de 15,7 mm³, para cada defeito 0,44 µg de teriparatida foi usado, o qual corresponde a aproximadamente 2 µL de teriparatida por defeito.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril

4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

O dia zero foi considerado na realização da orquiectomia (ORQ) e cirurgia fictícia (SHAM). No 30º dia, foi realizada a confecção do defeito ósseo e instalação dos implantes nas tíbias dos ratos. Na metade dos animais, os quais foram submetidos a análise por fluorocromos, 14 dias após a instalação dos implantes foi administrado pela via intramuscular 20mg/kg do fluorocromo calceína (LUVIZUTO *et al.*, 2011; RAMALHO-FERREIRA *et al.*, 2015). Passados mais 28 dias (42 dias após a instalação dos implantes), foi administrado o fluorocromo vermelho de alizarina, na dose de 20 mg/kg para cada animal (LUVIZUTO *et al.*, 2011; RAMALHO-FERREIRA *et al.*, 2015). A eutanásia destes animais foi realizada 60 dias após a instalação dos implantes (18 dias após a administração da alizarina).

A eutanásia de todos os animais foi realizada por sobredosagem de anestésico inalatório (Halotano, Tanohalo®, Cistália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Nova Itapira, Itapira, SP).

2.6 Análise Biomecânica

Previamente a eutanásia a análise biomecânica foi realizada, 8 animais dos grupos COAG, BG, BGPTH (referentes aos ORQ e SHAM), tiveram as metáfises das tíbias esquerdas reabertas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Conexão, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital acoplado ao monta-implante, foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Este valor foi anotado e tabulado para posterior avaliação estatística.

2.7 RT-PCR

Após a remoção do implante dos animais pela técnica do contra torque, a análise por PCR foi realizada removendo o osso da região tibial que esteve previamente em contato com implante. Através da extração para avaliar o ácido ribonucleico (RNA) presente no período de maturação óssea (60 dias). Após a remoção as amostras foram lavada com solução salina tampão fosfato (PBS), congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80° em um freezer para extração total de RNA. Para extração, foi utilizado o kit Sistema Total de Isolamento de RNA do SV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), seguido pela análise de quantificação, concentração e pureza.

A normalização da concentração total de RNA foi realizada (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), seguida da fabricação de cordões complementares de ácido desoxirribonucleico (cDNA), e a expressão de RT-PCR relacionada ao reparo ósseo foi realizada utilizando o método Sistema SybrGreen (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicado e o Taqman Universal PCR Master Mix foi adicionado às placas contendo os genes de interesse. Os volumes de cDNA foram calculados de acordo com a quantificação das amostras.

A reação de amplificação foi realizada e os resultados analisados com base no valor do limiar do ciclo (Ct), que permitiu a análise quantitativa dos genes de expressão de interesse, bem como dos genes relacionados na placa (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A análise de RT-PCR foi realizada com o objetivo de detectar a expressão genética relativa relacionada à RUNX2, fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OC).

Após a remoção das amostras os animais foram eutanásias por sobredosagem anestésica.

2.8 Análise Imunoistoquímica

Oito amostras (por grupo) dos animais foram removidas e reduzidas e fixadas em formaldeído a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, banhadas em água corrente por 24 horas e desmineralizadas em EDTA 10%. Em seguida, a desidratação foi realizada por sequência crescente de álcoois e diafanidade em xilol para posterior inclusão em

parafina e obtenção de cortes com espessura de 5 μm , sendo estes montados em lâminas.

A reação foi realizada em 4 peças por grupo, através do método de imunoperoxidase indireta com um amplificador. Peróxido de hidrogênio a 3% (Merck Laboratories) foi usado para inibir a peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das fatias em tampão fosfato de citrato, $\text{pH} = 6$, mantido em umidade quente, por 20 minutos. O bloqueio da reação inespecífica foi realizado com albumina bovina (Sigma). Os anticorpos primários utilizados foram contra WNT, β -Catenita, Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP) e osteocalcina (OC), considerando que estes anticorpos policlonais são produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology). Como anticorpo secundário, utilizou-se o anti-cabra de coelho (Pierce Biotechnology), e o amplificador foi avidina e biotina (Vector Laboratories) e o cromógeno a diaminobenzidina (Dako). No final da reação, a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina. A análise de imunomarcação foi completada através da atribuição do escore, sendo estes 1 pouca marcação, 2 moderada marcação e 3 intensa marcação.

O objetivo da análise de imunomarcação foi caracterizar a remodelação óssea através da proteína WNT/ β -Catenita, uma vez que o PTH 1-34 atua diretamente nesta via. Através da TRAP avaliado a atividade osteoclástica e osteocalcina o início da mineralização com precipitação com íon cálcio (tardio), íon que esta presente na composição fundamental do vidro bioativo.

2.9 Análise Histológica

O mesmo processamento das peças submetidas a análise imunoistoquímica foi realizado para as peças submetidas a análise histológica (outras 4 tibias de cada grupo). Após a obtenção das lâminas com 5 μm de espessura montadas em lâminas, as mesmas foram submetidas a coloração em hematoxilina e eosina (HE). Para avaliação da citoarquitetura óssea peri-implantar nos diferentes grupos.

2.10 Análise de Micro-CT

Após a redução e obtenção das peças ($n = 8$), as mesmas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Oito amostras de cada grupo foram mantidas em álcool 70% e submetidas à análise microtomográfica. Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), as peças foram escaneadas utilizando cortes de 8 μm de espessura (90Kv e 111 μA), com filtro de Al. 0,5mm e passo de rotação de 0.4 mm, resolução de 2016x1344 μm e com tempo de aquisição de 1h e 38min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 5, correção dos anéis de artefato de 7 e correção de BeamHardening de 40%. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas, sendo observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foram definidos, porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura da trabécula óssea (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N) e porosidade total (Po-tot), além da interface de contato osso implante (Bone Implante Contact – BIC) através da interseção de superfície (i.S) para então a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

2.11 Preparo e análise dos tecidos calcificados

Oito amostras de cada grupo após a fixação por 48 horas e lavagem por 24 horas, passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas.

Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilize apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina

Technovit, que foi fotopolimerizada e passaram pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha).

O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte (Exakt Cutting System, Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha), o desgaste e polimento ocorreu até a obtenção de secção de aproximadamente 80 µm de espessura.

2.12 Microscopia confocal à laser

Foram obtidos cortes longitudinais na região de interface osso/implante correspondentes à terceira, quarta e quinta espiras dos implantes. Estes cortes foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100). Sendo assim, a microscopia confocal obteve imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados.

Foram calculadas a taxa de aposição mineral óssea diária (MAR) e a área de osso neoformado (AON) na terceira rosca de cada lado do implante, à semelhança da metodologia de Johansson e Albrektsson (1987).

As imagens foram analisadas no programa Image J (Image Processing and Analysis Software, Bethesda, Maryland, USA). Através da ferramenta “free hands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina), bem como AON foram mensuradas.

Com a ferramenta straight a MAR, foram realizada através de 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 28, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados (DEMPSTER *et al.*, 2013).

2.13 Análises Elementar e Ultraestrutural

As análises ultraestruturais foram realizada em colaboração com “Grandfield Research Group”, sob supervisão da Dr^a Kathryn Grandfield na *McMaster University*.

As mesmas foram feitas no *Canadian Centre for Electron Microscopy* (CCEM), uma instalação de classe mundial localizada na Universidade McMaster em Hamilton, On, Canadá.

Foram avaliadas a resposta do biomaterial frente ao processo de regeneração óssea no defeito peri-implantar com ou sem funcionalização com PTH 1-34 no período de 30 dias. Para tanto, mais 8 animais por grupos (ORQ - BG e BGPTH; e SHAM - BG e BGPTH) foram submetidos as mesmas cirurgias citadas previamente porem com tempo de eutanásia reduzido para 30 dias a fim de ver o pico de neoformação antes do processo de remodelação. Estas peças foram incluídas em resina Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) cortadas ao meio pelo sistema de corte EXAKT e polidas, para posterior preparo e análises ultraestruturais.

É importante salientar que o grupo CLOT tanto SHAM quanto ORQ, não foram incluídos, uma vez que o objetivo desta análise foi avaliar de forma elementar e ultraestrutural a interface osso/biomateria com os diferente tratamentos da superfície do mesmo.

2.13.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é o primeiro estágio da análise de microscopia eletrônica a ser realizado e permitirá uma imagem de maior resolução dos implantes/biomaterial e do osso circundante para determinar a melhor região para remoção da amostra através da técnica de *Focus Ion Beam* (FIB). As amostras incorporadas foram polidas usando papel de carboneto de silício de 400 a 2400 grãos para expor a seção transversal da interface osso/biomaterial. As amostras foram preparadas com fita de carbono para fixação nos *stubs*, e fita de alumínio, e então pintadas como níquel quando necessário, posteriormente foram revestidas com uma camada fina de Carbono (~ 10 nm) para melhorar a condutividade no MEV. As imagens MEV fora realizada em um JEOL 6610 MEV (JEOL Ltd, Japão) operado em aceleração de 5 kV no modo de imagem com elétrons secundários e elétrons retroespalhados, que permite o contraste da composição e a distinção entre biomaterial e osso com base na massa atômica. As imagens foram gravadas em várias ampliações ao redor do implante para posterior seleção das

melhores áreas de contato osso/biomaterial, determinando desta maneira as regiões de interesse para o próximo estágio dos experimentos

2.13.2 Análise elementar dispersão de energia de raios-X (Elemental analysis by energy dispersive X-ray -EDX)

Na mesma amostra, através do equipamento FEI Magellan 400 SEM (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, USA) a análise elementar foi determinada pelo EDX operado em 10kV. Os dados do EDX foram coletados usando um detector EDAX Si(Li) e processados usando o software AZtec (Oxford Instruments 2020). Mapas elementares foram utilizados nos biomateriais na procura de alterações composicionais em Ca, P e Si. Foram eleitas as cores amarelo para Ca, vermelho para P e azul para Si (**Figura 2**). Além disso foi realizado também, a avaliação do escaneamento linear, com o qual foi possível avaliar o biomaterial de uma extremidade a outra, obtendo deste modo a presença dos elementos durante todo o percurso desta linha.

2.13.3 Microscopia de feixe de íons focado (Focused Ion Beam Microscopy -FIB)

Após a realização da microscopia eletrônica de varredura, foi possível realizar a microscopia de feixe de íons focada (FIB), que permite preparar uma amostra para microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise esta, que requer amostras de cerca de 100-200 nm de espessura. O FIB é um instrumento de feixe duplo, com uma coluna MEV para permitir a geração de imagens da amostra e uma coluna de feixe de íons Gálio (Ga) capaz de realizar a fresagem precisa da amostra. Com essas duas funções, pudemos selecionar uma interface de interesse entre osso-biomaterial e fresar um pequeno pedaço precisamente (**Figura 3**). O tamanho médio da amostra extraída do bloco (biomaterial/osso) é de 10 μm x 6 μm , sendo assim, grande suficiente para analisar através da MET a nano-osteocondução.

Cada amostra foi preparada de acordo com a técnica de levantamento *in situ* (JARMAR *et al.*, 2008) em uma NVision 40 FIB/MEV (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) equipado com uma coluna de íons de gálio de 30 kV. A área de interesse na

interface osso/biomaterial foi protegida por deposição de carbono (1µm de espessura) para proteção da região de interesse (12x1,2 µm). Uma camada espessa de 3 µm de tungstênio foi então depositada na mesma região por deposição por feixe de íons. O material em torno do ROI foi fresado aproximadamente a uma tensão de aceleração de 30 kV, usando correntes progressivamente mais baixas (45 nA, 27 nA, 13 nA e 6,5 nA) à medida que o ROI era abordado. A seção foi retirada usando um micromanipulador Kleindiek (Kleindiek Nanotechnik GmbH, Reutlingen, Alemanha) e fixada no topo de uma grade de cobre MET. Em seguida foi depositado sobre o carbono uma camada de tungstênio para maior proteção, pois em seguida deu-se início ao corte da amostra para remoção da mesma utilizando corrente de 6,5nA. Após a secção total da amostra a mesma foi removida e anexada a grade do MET através da deposição de tungstênio e então reduzido até uma espessura final de aproximadamente 200-300 nm em diferentes etapas a 30 kV usando correntes progressivamente mais baixas iguais a 150 pA, 80 pA e 40 pA. O polimento final foi realizado em duas etapas subsequentes, primeiro a 10 kV com uma corrente de 80 pA e depois a 5 kV com uma corrente de 60 pA. Esta técnica segue os padrões descrito por Grandfield *et al.*, (2012). Esta amostra pode ser usada para avaliação da MET.

2.13.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta que possui várias técnicas adequadas para estudar a osseointegração. Neste trabalho, usamos as imagens para examinar a conexão entre osso e o BioGran®, para entender a distribuição e orientação das fibras de colágeno, além da dissolução do biomateria e comportamento presente nessa interface nos animais que receberam BioGran® isolado ou funcionalizado com PTH 1-34 .

2.13.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF)

Após amostras prontas, a análise de campo escuro anular de alto ângulo feita através da microscopia eletrônica de transmissão e varredura (scanning transmission electron microscope high-angle annular dark-field – HAADF-STEM) foi usada para imagens de contraste Z- (número atômico) da interface osso-biomaterial no Titan 80-300 (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, EUA) operado a 300 kV com um ângulo de convergência de 6,3 para adquirir imagens de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF) (GRANDFIELD *et al.*, 2012). Nesta forma de imagem, o contraste é proporcional ao número atômico, o que nos permite gravar imagens sem o uso de manchas de metais pesados que alteram a química do osso, como é realizado em muitos estudos microscópicos de luz.

2.14 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma 8.1.1. A análise da homocedasticidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste one-way ANOVA foi usado para avaliação de todos parâmetros de biomecânica, Micro-CT, além de MAR, ELCOI e AON referentes a mensuração dos fluorocromos sobrepostos, e quando necessário o pós-teste de Tukey. Para análise dos dados referente a área de fluorocromos o teste two-way ANOVA foi utilizado. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 *Análise Histológica*

A análise histológica mostrou as características morfológicas do tecido ósseo formado junto ao defeito peri-implantar, nos diferentes grupos experimentais (**Figura 4**).

Nos grupos SHAM, cirurgia fictícia, foi observado que quando o defeito peri-implantar foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo (CLOT), segundo a metodologia proposta, a presença de discreta formação de tecido ósseo na região de interesse (contato das espiras com a região do canal medular). Foram observadas algumas ilhas de tecido ósseo formado junto às espiras do implante e predominantemente tecido medular na região de interesse. A utilização do BioGran® sonificado (BG) levou a uma resposta reparacional com tecido ósseo mais organizado em relação ao grupo CLOT, com presença de tecido ósseo formado próximo às espiras do implante, tecido este constituído de matriz mineralizada e osteócitos em suas lacunas. Neste grupo também havia presente o tecido medular logo abaixo do tecido ósseo peri-implantar. A funcionalização do BioGran® com a teriparatida (BGPTH) mostrou um padrão de tecido ósseo com um maior grau de maturidade, com maior predomínio de tecido ósseo na região peri-implantar, e um grau de maturidade caracterizado pela presença da matriz extracelular mineralizada bem como os osteócitos em suas lacunas, para este grupo discreta presença de tecido medular junto ao tecido ósseo peri-implantar foi encontrado.

Nos grupos orquiectomizados (ORQ), havia no grupo CLOT presença de tecido ósseo neoformado na região peri-implantar, com presença de osteócitos, também tecido conjuntivo em organização, mostrando que neste grupo há um grau de maturidade tecidual superior ao grupo SHAM CLOT. No grupo ORQ que recebeu o BioGran® sonificado (BG), observa-se a presença de tecido ósseo peri-implantar maduro, com grande quantidade de osteócitos no interior das suas lacunas. Nota-se um maior grau de maturidade deste tecido quando comparado ao grupo SHAM BG. No grupo ORQ BGPTH, observa-se o tecido ósseo peri-implantar em remodelação, junto às espiras dos implantes, suportado por um tecido ósseo maduro. Este grupo mostrou o padrão tecidual de maior maturidade quando comparado aos demais grupos experimentais avaliados.

3.2 Imunoistoquímica

As imunomarcações foram realizadas com o objetivo de avaliar a presença de proteínas que sinalizam importantes eventos do processo de reparo ósseo peri-implantar. Foram avaliadas proteínas relacionadas a formação, mineralização e reabsorção óssea (**Figura 5 e Tabela 3**).

As proteínas WNT e Beta catenina são sinalizadoras de uma via de formação óssea, através da ativação das respostas de osteoblastos (via WNT/Beta catenina). Estas proteínas mostram-se presentes em células da linhagem osteoblástica, desde osteoblastos, predominantemente e também osteócitos. Para a proteína WNT, notou-se que no grupo SHAM CLOT, em função da baixa quantidade de tecido ósseo peri-implantar, discreta presença para estas proteínas nas células osteoblásticas, assim como nos grupos SHAM BG e SHAM BGPTH. Vale destacar que para SHAM, as respostas de imunomarcação para o BG foram superiores ao grupo BGPTH. A beta catenina, proteína ativada pela via Wnt, também presente em células da linhagem osteoblástica, mostrou-se marcada de forma discreta no grupo SHAM CLOT. No grupo SHAM BG, foi possível observar importante presença desta proteína em células da linhagem osteoblástica presentes na região próximas às espiras. Já no grupo SHAM BGPTH, notam-se poucas células marcadas positivamente para esta proteína.

Nos grupos ORQ, observou-se um padrão de tecido ósseo mais maduro, formado junto às espiras dos implantes, especialmente nos grupos BG e BGPTH. Assim, observou-se uma discreta marcação no CLOT, com uma menor quantidade de tecido ósseo formado na região de interesse. Já no grupo BG, observou-se importante imunomarcação para a proteína WNT, em osteócitos bem como em células da linhagem osteoblástica presentes no tecido medular. No grupo BG-PTH, observou-se um tecido ósseo bem organizado e em atividade de remodelação óssea, com células osteoblásticas marcadas positivamente para a proteína WNT. Padrão semelhante de imunomarcação foi observado para a proteína Beta Catenina.

A proteína TRAP, que marca a atividade de reabsorção óssea, ativada a partir do momento que o processo reparacional atinge a etapa de remodelação óssea, mostrou-se marcado de forma discreta no grupo SHAM CLOT. Já no grupo SHAM BG e SHAM

BGPTH, foi possível notar células osteoclásticas marcadas positivamente para a TRAP. Já nos animais orquiectomizados (ORQ), notou-se uma marcação discreta para o CLOT, moderada para BG e BGPTH. Esta marcação moderada para os últimos dois grupos é compatível com o padrão de tecido ósseo mais organizado quando há presença do BioGran® funcionalização ou não com teriparatida, no grupo de animais com a alteração sistêmica.

A osteocalcina (OC), proteína marcadora da mineralização óssea e que se apresenta positivamente marcada em células da linhagem osteoblástica bem como na precipitação da matriz mineralizada do tecido ósseo, mostrou-se marcada de forma moderada para os grupos BG e BGPTH, nos animais SHAM. Vale destacar que no grupo BG, foi observado um tecido ósseo mais maduro com importante precipitação de osteocalcina sobre o tecido ósseo peri-implantar. Para o grupo de animais orquiectomizados (ORQ), observou-se uma precipitação de osteocalcina sobre a matriz mineralizada nos 3 subgrupos: CLOT, BG e BGPTH. Nota-se um importante grau de maturação do tecido ósseo peri-implantar nos animais deste grupo em comparação aos animais SHAM.

3.3 RT-PCR

Para todos os parâmetros avaliados no RT-PCR o grupo SHAM CLOT foi considerado o padrão recebendo o valor fixo de 1 e os demais foram avaliados através desta referência.

Para a expressão genética relativa de RUNX2, foi possível observar maiores valores para o grupo SHAM BG (1,115), seguido pelo SHAM BGPTH (0,94). Os grupos ORQ CLOT, ORQ BG e ORQ BGPTH apresentaram os menores resultados, com 0,197, 0,0383 e 0,29 respectivamente. Na comparação intragrupo tanto ORQ quando SHAM não apresentaram resultados estatisticamente significante (ANOVA, $p > 0,05$), já as comparações entre cada um dos grupos ORQ vs SHAM, todos os resultados foram estatisticamente significante (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6A**).

Para ALP, a expressão genética relativa dos grupos ORQ BG (0,808), SHAM BG (1,118) e SHAM BGPTH (1,451) não obtiveram resulta estatisticamente significante quando comparado com SHAM CLOT (padrão de comparação; valor 1,0).

Já o grupo ORQ CLOT apresentou o menor resultado (0,33) sendo este estatisticamente significativo quando comparado a SHAM CLOT (Tukey, $p = 0,0046$). O maior expressão genética relativa foi encontrada para ORQ BGPTH com 6,044 resultado este estatisticamente significativo quando comparado a todos demais grupos (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6B**).

A expressão genética relativa de OC, apresentou valores próximos para os grupos SHAM CLOT (1,0), SHAM BG (1,283), SHAM BGPTH (1,706), ORQ BG (1,569) e ORQ BGPTH (1,489), os quais não obtiveram resultados estatisticamente significante nas comparações (ANOVA, $p > 0,05$). Já a menor expressão genética relativa encontrado, referente ao grupo ORQ CLOT (0,5) obteve resultado estatisticamente significativo quando comparado aos grupos ORQ BG, ORQ BGPTH e SHAM BGPTH (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6C**).

3.4 *Análise Biomecânica*

Para o contra torque, os resultados obtidos referentes ao torque máximo usado para remoção dos implantes foram maiores para os grupos SHAM BGPTH e SHAM BG com valores de 9,6 N.cm e 8,2 N.cm respectivamente, seguidos pelo ORQ BGPTH com 6 N.cm. Já SHAM CLOT, ORQ BG e ORQ CLOT mostraram os menores resultados com 5,8 N.cm, 4,4 N.cm e 3 N.cm respectivamente. É importante destacar que o torque necessário para remoção do implante dos animais osteoporóticos que receberam o BioGran® com o PTH (1-34) (ORQ BGPTH), não foi estatisticamente significativo quando comparado com os animais saudáveis que usaram apenas o BioGran® puro (SHAM BG) (Tukey, $p = 0,3814$), já a comparação de ORQ x SHAM dos animais que receberam este biomaterial sem PTH (BG) foi estatisticamente significativo (Tukey, $p = 0,0241$) (**Figura 7**).

3.5 *Micro-CT*

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente a medida da porcentagem de volume óssea (BV/TV), foi encontrado os seguintes resultados para o grupo SHAM BG-PT, SHAM BR e SHAM CLOT: 64,40%, 60,22% e 29,79%. Já para os animais orquiectomizados (ORQ) o maior percentual ósseo esteve presente no grupo

BGPTh com 60,32%, a utilização do BioGran® puro foi capaz de formar 50,37% de osso no defeito peri-implantar criado, e o grupo CLOT teve 27,57% de volume ósseo (**Figura 8**).

Referente as trabéculas ósseas peri-implantares, a espessura trabecular (Tb.Th) mostrou resultados aproximados entre todos os grupos tanto SHAM quanto ORQ, obtendo os seguintes resultados: SHAM CLOT (0,1028 mm), SHAM BG (0,1132 mm), SHAM BGPTh (0,1133 mm), ORQ CLOT (0,098 mm), ORQ BG (0,100 mm) e ORQ BGPTh (0,102 mm), sem diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$) (**Figura 9**). Porém outro padrão foi encontrando para a separação das trabéculas (Tb.Sp), o qual apresentou resultados aproximados entre SHAM BGPTh (0,1 mm) e SHAM BG (0,098 mm), e ORQ BGPTh (0,1 mm) e ORQ BG (0,097 mm), com aumento da separação entre as trabéculas para SHAM CLOT (0,1303 mm) e ORQ CLOT (0,135 mm), pode-se notar resultados estatisticamente significante na comparação de SHAM e ORQ BG e BGPTh vs SHAM e ORQ CLOT (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 10**). Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido para os grupos ORQ e SHAM respectivamente uma média de 2,797/mm e 3,483/mm para CLOT o qual apresentou-se inferior quando comparado a ORQ e SHAM BG com 5,344/mm e 5,45/mm, e BGPTh com 5,255/mm e 5,651/mm respectivamente (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 11**).

Em relação a porosidade da área referente ao defeito peri-implantar avaliada através da porcentagem de porosidade total (Po.tot), os valores de ORQ foram 72,41% (CLOT), 45,99% (BG) e 43,28% (BGPTh) e de SHAM foram 70,2% (CLOT), 39,65% (BG) e 35,59% (BGPTh). Mostrando então menor percentual de porosidade nos grupos BGPTh e BG quando comparado com CLOT (Tukey, $p < 0,05$), tanto para SHAM quanto para ORQ (**Figura 12**).

Já a interseção entre osso e implante, ou seja, o contato presente entre o osso e implante (BIC), foi possível avaliar tridimensionalmente uma área maior para o grupo BGPTh tanto para SHAM (21,93 mm²) quanto para ORQ (18,93 mm²), neste parâmetro não houve diferença estatisticamente significativa na comparação destes dois grupos (Tukey, $p > 0,05$). Não houve também diferença estatisticamente significativa na comparação de ORQ BGPTh e SHAM BG (Tukey, $p < 0,05$), o que mostra ser mais um parâmetro em que o defeito peri-implantar do animal osteoporótico preenchido com o

biomaterial funcionalizado com PTH tem o mesmo comportamento reparacional do animal saldável tratado com biomaterial puro (**Figura 13**).

A renderização tridimensional representativa de cada grupo pode ser avaliada na **figura 14**, na qual podemos notar o volume ósseo presente nos diferentes grupos de acordo com a condição dos animais.

3.6 Microscopia Confocal à Laser

Os fluorocromos serviram para marcação da matriz de cálcio, através da calceína (verde) e alizarina (vermelho), demonstrando assim, a dinâmica do osso peri-implantar durante o reparo do defeito nos grupos experimentais. Isto permitiu as avaliações de dinâmica óssea, e deposições de cálcio diárias, além da área de neoformação óssea. A ilustração representativa deste resultado pode ser avaliada na **figura 15**.

Na avaliação intragrupo da área de fluorocromos em verde e vermelho não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p > 0,05$). Já na comparação intergrupos, a média dos resultados obtidos mostrou o maior resultado numérico para os grupo SHAM BGPTH sendo estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (Tukey, $p < 0,05$). Outro dado muito importante foi a semelhança presente quando comparado o SHAM BG ao ORQ BGPTH (Tukey, $p > 0,05$), o que mostrou uma característica parecida do animal osteoporótico que usou o biomaterial com PTH local em comparação ao animal saldável que fez uso do biomaterial isolado, mostrando que o a funcionalização do BioGran® com PTH leva a uma condição no reparo de defeitos peri-implantar de ratos osteoporóticos semelhante a um animal salvável que recebeu BioGran® puro (**Figura 16**).

Na avaliação da deposição mineral óssea diária os resultados encontrados foram: SHAM: 1,67 μm (CLOT), 3,62 μm (BG) e 3,94 μm (BGPTH); e para ORQ: 1,07 μm (CLOT), 2,48 μm (BG) e 3,08 μm (BGPTH). Após a análise estatística foi possível avaliar o mesmo padrão encontrado na avaliação da área de fluorocromos, em que neste caso houve um aumento na deposição mineral diária causada pelo PTH tópico nos animais osteoporóticos, em que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com SHAM BG (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 17**).

No contexto de neoformação óssea, foi possível observar resultados ainda mais favoráveis no que se diz respeito ao reparo de defeitos peri-implantar em ratos osteoporóticos tratados com biomaterial funcionalizado com anabólico ósseo (PTH), o qual não apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais SHAM BG e SHAM BGPTH (Tukey, $p>0,05$) (**Figura 18**).

3.7 Análises Elementar e Ultraestrutural

3.7.1 Análise elementar de dispersão de energia de raios-X (Elemental analysis by energy dispersive X-ray -EDX)

A análise elementar foi realizada nas peças com período de 30 dias. Foi possível notar através do mapeamento das partículas dos diferentes grupos, o padrão dos elementos presente no BioGran® relacionando principalmente os elementos necessários para a mineralização, Ca e P, além da Si componente principal do biomaterial.

Para o grupo SHAM, tanto BG quanto BGPTH, foi possível notar a presença de Ca e P nas extremidades do biomaterial, e uma grande quantia de Si ainda presente no centro da partícula, mostrando a presença do processo de troca de íons (Si x Ca e P) existente neste tipo de biomaterial, porém o mesmo acontece de forma mais lenta. (**Figura 19A e C**). Para o grupo ORQ BG e BGPTH, a troca de íons parece ser mais intensa, sendo possível notar menor quantidade de Si no interior das partículas e maior área periférica com Ca e P. (**Figura 20A e C**)

A linha para avaliação elementar traçada na partícula dos grupos SHAM BG e BGPTH mostrou uma quantidade muito baixa (quase ausente) de Si nas extremidades (predominância de Ca e P) e muito alta (aproximadamente 3,5X mais quando comparada a Ca e P) na região central do biomaterial, além dessa extensão de Si apresentar em média 200 μ m para ambos grupos (**Figura 19B e D**). Para ORQ BG a maior porção do biomaterial possuía Ca e P na extremidade, porém baixa quantidade de Si no interior da partícula estava presente com aproximadamente 100 μ m de extensão. A quantidade de Si no interior chegava a ser quase o dobro quando comparada a Ca e P (**Figura 20B**). Para o grupo ORQ BGPTH os resultados foram parecidos com o grupo ORQ BG, com extensão de Si é aproximadamente a mesma 100 μ m, porém a contagem era quase a mesma do Ca e P (**Figura 20D**).

3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF)

As imagens HAADF mostraram a conexão entre o osso e biomaterial em escala nanométrica, a fim de entender se existe um gradiente estrutural ou zona interfacial entre o osso e o biomaterial. Essa técnica também permitiu uma avaliação da qualidade do osso desenvolvido pela imagem do arranjo mineral-colágeno ósseo. Em todas as amostras foi possível notar íntimo contato do osso neoformado com o biomaterial.

No grupo SHAM BG, foi observado dissolução externa do biomaterial irregular a qual apresentou-se em média 150 nm, além de uma dissolução em sentido ao interior da partícula do BioGran® com separação quase total de uma micropartícula. No interior desta área, maior área de dissolução foi encontrada com aproximadamente 300 nm, além de uma área na condição de neoformação óssea. O osso formado ao redor da partícula de BioGran®, apresentou característica de um osso imaturo ainda com as fibras colágeno desorganizadas (**Figura 21**).

A amostra referente ao grupo SHAM BGPTH, mostrou uma mesma condição óssea do grupo BG, osso imaturo e desorganizado. Nenhuma área de dissolução no sentido interior do biomaterial foi encontrado. Já a área de dissolução externa era regular (superfície do biomaterial linear) com aproximadamente 350nm de extensão. Foi possível observar íntimo contato do osso formado com a partícula do biomaterial (**Figura 22**).

No grupo ORQ BG, foi possível notar presença de osso ainda imaturo, porém com maior quantidade de fibras colágeno paralelas ao biomaterial no sentido ascendente. A dissolução presente era irregular com aproximadamente 180nm de extensão, porém sem a presença de dissolução no sentido interno da partícula(**Figura 23**).

Já no grupo ORQ BGPTH, foi possível observar área linear na porção mais superficial com dissolução do biomaterial de aproximadamente 770nm e uma maior área de dissolução em sentido central da partícula na porção mais interna. Nesta área de maior dissolução foi possível observar a presença de um área com condições de neoformação óssea indo em sentido do interior da partícula. A área de dissolução

imediatamente após esta região era de aproximadamente 900nm. O osso presente na amostra estava em íntimo contato com a partícula e apresentava uma condição mais madura, sendo visível as bandas de colágeno, os quais estavam paralelos ao biomaterial, mostrando maior organização óssea (**Figura 24**).

4 DISCUSSÃO

O método sonoquímico foi eleito para a funcionalização do biomaterial proposto no presente trabalho pois o mesmo viabiliza a utilização de grande variedade de materiais nanoestruturados a partir de ondas ultrassônicas em meio líquido, que causam transformações químicas e físicas na amostra devido à interação da radiação com a matéria (CHAN *et al.*, 2002; LISBOA-FILHO *et al.*, 2018). Na sonoquímica, os efeitos surgem a partir do fenômeno de cavitação acústica, ou seja, a formação, crescimento e colapso implosivo de bolhas em líquidos com tempo de vida na ordem de microssegundos, obtendo desta forma a mistura e homogeneização de duas ou mais substâncias distintas (CHAN *et al.*, 2002).

Há relatos na literatura da utilização desta técnica para funcionalização de um biomaterial a base de sílica (BioGran® - Biomet 3i, Palm Beach Gardens, Flórida, USA) com uma medicação moduladora dos receptores seletivos de estrógeno (Raloxifeno - Evista®, Lilly, USA) (LISBOA-FILHO *et al.*, 2018). Este é o único trabalho descrito referente a tentativa de melhorar biomateriais sintéticos destinados a enxertia óssea, no presente trabalhos testamos uma medicação de ação anabólica no tecido ósseo que atua diretamente na via WNT sinalizando desta forma a formação de tecido ósseo. Além disso, um importante ponto foi o tempo utilizado para sonoquímica, o qual foi realizado com uma duração de 15 minutos, uma vez que já foi comprovado que este é o melhor tempo quando comparado à 30, 45 ou 90 minutos de sonicação (GOMES-FERREIRA *et al.*, 2019).

Para confecção deste trabalho, o biomaterial BioGran® foi escolhido por apresentar propriedades osteocondutoras satisfatórias e já ser utilizado como opção de enxerto ósseo em odontologia (PEREIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2010). O método sonoquímico foi empregado por ser economicamente viável e eficiente na redução e homogeneização de partículas devido à sua capacidade de fornecer alta pressão em pouco tempo, induzindo uma rápida alteração morfológica (ARRUDA; ORLANDI; LISBOA-FILHO, 2013; TAGHIPOUR *et al.*, 2018).

A interface implante/enxerto/ósseo constitui uma situação de reparo complexa, a qual envolve revascularização, a incorporação do enxerto e a integração dos implantes (SJOSTROM *et al.*, 2005). A associação de biomateriais aos implantes vem sendo

estudada e empregada frequentemente nos casos de defeitos peri-implantares pós-exodônticos e de fenestrações ósseas (JUNG *et al.*, 2009).

É muito importante entender a reação química existente por trás do processo de osteocondução presente no BioGran®, uma vez que se trata de um biomaterial a base de Sílica (SiO_2 45%), mas possui também em sua composição CaO (24,5%), Na_2O (24,5%) e P_2O_5 (6%) (SCHEPERS *et al.*, 1991). Após o contato com os fluidos corporais o biomaterial inicia uma troca de íons, no qual a Si é liberada pelo biomaterial, o que faz com que Ca e P do meio externo entre na partícula, sobre o biomaterial forma-se um gel de Si e sobre esse gel uma camada de CaP (fosfato de cálcio). As células de fagocitose inicia a reabsorção destas camadas e, após esta reabsorção, células mesenquimais penetram pequenos ductos e aderem-se a camada de CaP formada mais interiormente, esta mesma é diferenciada em osteoblastos e inicia o processo de formação óssea no biomaterial mesmo não havendo a presença de osso prévio no local (SCHEPERS *et al.*, 1991).

Este processo é confirmado através de EDX realizada nas amostras dos diferentes grupos do presente trabalho, uma vez que no período de 1 mês (período de formação óssea), já houve perda de Si do biomaterial e pôde-se notar presença de Ca e P na periferia das partículas em ambos os grupos. Para ORQ BG e ORQ BGPTH esse processo parece ser mais acentuado e a troca de íons intensificada uma vez que a camada de Ca e P na periferia do biomaterial é maior do que a de Si no interior da partícula.

A utilização de uma medicação anabólica óssea como funcinalizador de uma partícula de biomaterial é algo que de fato pode melhorar o desempenho na formação óssea. Isso é possível ser avaliado desde uma análise manométrica da interface desse biomaterial por MET, assim como avaliação do RNA presente no osso peri-implantar no momento da eutanásia até o volume e qualidade do osso formado.

A análise por RT-PCR no período de remodelação óssea (60 dias), mostrou através da RUNX2 uma diferenciação osteoblástica normal para todos grupos dos animais SHAM uma vez que não obtiveram resultados estatisticamente significante quando comparado a SHAM CLOT, já para ORQ os grupos apresentaram todos resultados menores sendo estes estatisticamente significantes na comparação com SHAM CLOT. Já a ALP, mostra maior expressão genética relativa para ORQ BGPTH,

sendo este o maior resultado referente a sinalização para a deposição de fosfato ($p < 0,05$ quando comparados aos demais grupos). Além disso, é possível notar uma sinalização similar para OC em todos os grupos dos animais SHAM e nos grupos ORQ BG e ORQ BGPTH, mostrando assim que o estímulo para mineralização esta presente também nos animais orquiectomizados tratados com biomaterial com ou sem PTH 1-34.

Foi possível avaliar durante o torque aplicado para a remoção dos implantes (análise biomecânica), que a orquiectomia reduz consideravelmente a quantidade de força aplicada para essa remoção, ou seja, no animal osteoporótico há uma menor osseointegração quando comparada aos animais saudáveis em seus respectivos testes (ORQ x SHAM – CLOT, BG e BGPTH). Porém um dado muito relevante é que não há diferença estatisticamente significativa quando comparado o animal saudável que recebeu apenas BioGran® (SHAM BG) ao animal osteoporótico que recebeu BioGran® funcionalizado com PTH 1-34 (ORQ BGPTH), sendo assim para esta análise a aplicação tópica da medicação ao biomaterial mostrou um resultado similar aos animais saudáveis que simulam a aplicabilidade clínica do biomaterial em defeitos peri-implantares na prática odontológica.

Este resultado de contra torque pode estar diretamente relacionado ao resultado obtido através do BIC, o qual mostra os melhores valores numéricos de contato osso/implante nos grupos SHAM BG, ORQ BGPTH e SHAM BGPTH. resultados estes que não há diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si (ANOVA, $p > 0,05$). Isso mostra que o biomaterial funcionalizado com PTH 1-34 não apresenta muita diferença nos ratos saudáveis, mas aumenta o contato osso/implante e o torque necessária para remover os implantes em ratos na condição de osteoporose.

A avaliação microtomográfica das amostras, mostrou que o volume ósseo, espessura, separação e número de trabéculas apresentaram resultados estatisticamente significante somente na comparação dos grupos com biomaterial com ou sem funcionalização (SHAM BG, SHAM BGPTH, ORQ BG, ORQ BGPTH) em relação ao grupos preenchidos somente com coagula (SHAM-CLOT, ORQ-CLOT) (Tukey, $p < 0,05$).

Na avaliação da deposição mineral óssea diária (MAR), os resultados mostraram semelhante ao contra torque, em que o grupo ORQ BGPTH não houve diferença estatisticamente significativa quando comprar ao modelo experimental que arremete ao

usual na clínica odontológica (pacientes saudáveis utilizando apenas o biomaterial) (SHAM BG) (ANOVA, $p>0,05$). Já a utilização do PTH 1-34 nos ratos saudáveis melhorou a deposição de cálcio quando comparado aos osteoporóticos usando o mesmo biomaterial funcionalizado (Tukey, $p<0,05$).

Porem quando avaliado a área de fluorocromos (calceína e alizarina), não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre SHAM BG vs ORQ BGPTH vs SHAM BGPTH (ANOVA, $p>0,05$). Este resultado mostra que de fato há maior precipitação de cálcio quando o biomaterial é funcionalizado com PTH 1-34 levando os animais osteoporóticos a se assemelhar aos animais saudáveis.

O mesmo padrão de resultado foi encontrando para área de osso neoformada, em que para SHAM BG, ORQ BGPTH e SHAM BGPTH não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p>0,05$). Esses padrões de neoformação leva a crer que há maior função do PTH 1-34 tópico nos animais osteoporóticos, quando comparado ao mesmo potencial nos animais SHAM.

Foi possível avaliar este mesmo padrão na análise manométrica realizada através do MET, em que no período de 1 mês mostrou um padrão ósseo ainda imaturo para SHAM BG e SHAM BGPTH, já o grupo ORQ BG mostrou ainda desorganização das fibras colágenas, porem em alguns pontos iniciais de organização das fibras, mostrando assim leve grau de maturação óssea. Já no grupo ORQ BGPTH foi possível notar maior maturação óssea com fibras colágenas mais organizadas paralelas ao biomaterial e com a presença das bandas de colágeno bem definidas. Outro ponto relevante foi a maior extensão da dissolução das partículas para os biomateriais que possuíam o PTH 1-34 tópico, o qual apresentou-se ainda maior nos animais orquiectomizados quando comparado aos saudáveis. Esse processo nos leva a crer que PTH 1-34 tópico acelera a formação óssea e como consequente a dissolução do biomaterial para que haja um processo de neoformação mais rápida.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos por este estudo, foi possível concluir que é fundamental a utilização de biomaterias para o preenchimento de defeitos peri-implantares. Além disso a ação tópica do PTH 1-34 é expressa pelo aumento da formação óssea e precipitação de cálcio local, o qual é ainda mais relevante quando usado nos animais osteoporóticos. Os animais osteoporóticos que receberam biomaterial funcionalizados com PTH 1-34 apresentaram resultados similares aos animais saudáveis que receberam apenas o biomaterial isolado como material preenchedor.

REFERÊNCIAS

- AL-SHAHAT, A. R. *et al.* Prostatic assessment in rats after bilateral orchidectomy and calcitonin treatment. **Endocr. Regul.**, v. 45, n. 1, p. 29-36, Jan. 2011.
- ANNIBALI, S. *et al.* Short dental implants: a systematic review. **J. Dent. Res.**, v. 91, n. 1, p. 25-32, Jan. 2012.
- ARRUDA, L. B.; ORLANDI, M. O.; LISBOA-FILHO, P. N. Morphological modifications and surface amorphization in ZnO sonochemically treated nanoparticles. **Ultrason. Sonochem.**, v. 20, n. 3, p. 799-804, May 2013.
- BRANEMARK, P. I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.**, v. 16, p. 1-132, 1977.
- CAULEY, J. A. Osteoporosis: fracture epidemiology update 2016. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 29, n. 2, p. 150-156, Mar. 2017.
- CHAN, C. *et al.* Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, n. 1, p. 73-77, Feb. 2002.
- CHIAPASCO, M. *et al.* Evaluation of peri-implant bone resorption around Straumann Bone Level implants placed in areas reconstructed with autogenous vertical onlay bone grafts. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 23, n. 9, p. 1012-1021, Sept. 2012.
- DARBY, I. Periodontal materials. **Aust. Dent. J.**, v. 56, sup. 1, p. 107-118, Jun. 2011.
- DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **Int. J. Prosthodont.**, v. 11, n. 5, p. 391-401, Sept./Oct. 1998.
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J. Dent. Educ.**, v. 67, n. 8, p. 932-949, Aug. 2003.
- DE OLIVEIRA, D. *et al.* Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchietomized rats. **Clin. Oral Investig.**, v. 23, n. 5, p. 2313-2322, 2019.
- DE OLIVEIRA PUTTINI, I. *et al.* Teriparatide improves alveolar bone modelling after tooth extraction in orchietomized rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 102, p. 147-154, Jun. 2019.
- DEMPSTER, D. W. *et al.* Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res.**, v. 28, n. 1, p. 2-17, Jan 2013.
- DRAGE, N. A. *et al.* A comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 18, n. 4, p. 496-500, Aug. 2007.
- DRAKE, M. T.; KHOSLA, S. Male osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 41, n. 3, p. 629-641, Sept. 2012.
- FARAHMAND, P.; SPIEGEL, R.; RINGE, J. D. Male osteoporosi]. **Z. Rheumatol.**, v. 75, n. 5, p. 459-465, Jun. 2016.
- FINKELSTEIN, J. S. *et al.* The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n. 13, p. 1216-1226, Sep 25 2003.

- FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. **Implant Dent.**, v. 6, n. 2, p. 93-101, 1997.
- GENNARI, L.; NUTI, R.; BILEZIKIAN, J. P. Aromatase activity and bone homeostasis in men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 12, p. 5898-5907, Dec. 2004.
- GIUSTI, A.; BIANCHI, G. Treatment of primary osteoporosis in men. **Clin. Interv. Aging**, v. 10, p. 105-115, 2015.
- GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* Sonochemical time standardization for bioactive materials used in peri-implantar defects filling. **Ultrason. Sonochem.**, v. 56, p. 437-446, Sept. 2019.
- GOMES-FERREIRA, P. H. S. *et al.* Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchietomized rats. **Osteoporos Int.** May. 2020.
- GRANDFIELD, K. *et al.* Bone response to free-form fabricated hydroxyapatite and zirconia scaffolds: a transmission electron microscopy study in the human maxilla. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, n. 3, p. 461-469, Jun 2012.
- GRUBER, R.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 28, n. 9, p. 1139-1146, Sept. 2017.
- GULATI, K. *et al.* Drug-releasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 69, p. 831-840, Dec. 2016.
- ISIDOR, F. Influence of forces on peri-implant bone. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 17 sup. 2, p. 8-18, Oct. 2006.
- IVANOFF, C. J. *et al.* Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 12, n. 2, p. 128-134, Apr. 2001.
- JARMAR, T. *et al.* Technique for preparation and characterization in cross-section of oral titanium implant surfaces using focused ion beam and transmission electron microscopy. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. Part A, n. 87A, p. 1003-1009, 2008.
- JOHANSSON, C.; ALBREKTSSON, T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 2, n. 2, p. 69-75, 1987.
- JUNG, R. E. *et al.* A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 20, n. 2, p. 162-168, Feb. 2009.
- KAUFMAN, J. M.; GOEMAERE, S. Osteoporosis in men. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 22, n. 5, p. 787-812, Oct. 2008.
- KAUFMAN, J. M.; LAPAUW, B.; GOEMAERE, S. Current and future treatments of osteoporosis in men. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 28, n. 6, p. 871-884, Dec. 2014.

- KHOSLA, S.; AMIN, S.; ORWOLL, E. Osteoporosis in men. **Endocr. Rev.**, v. 29, n. 4, p. 441-464, Jun. 2008.
- KUROSHIMA, S. *et al.* Optimally oriented grooves on dental implants improve bone quality around implants under repetitive mechanical loading. **Acta Biomater.**, v. 48, p. 433-444, Jan. 2017.
- LEUNG, K. C. *et al.* Peri-implant bone loss: management of a patient. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 16, n. 2, p. 273-277, Mar./Apr. 2001.
- LISBOA-FILHO, P. N. *et al.* Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. **Connect Tissue Res.**, v. 59, sup., p. 97-101, Dec. 2018.
- LUVIZUTO, E. R. *et al.* Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 984-990, Oct 2011.
- MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.**, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.
- MITTAN, D. *et al.* Bone loss following hypogonadism in men with prostate cancer treated with GnRH analogs. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 8, p. 3656-3661, Aug. 2002.
- NIIMI, R. *et al.* Analysis of daily teriparatide treatment for osteoporosis in men. **Osteoporos Int.**, v. 26, n. 4, p. 1303-1309, Apr. 2015.
- OLIVEIRA, D. *et al.* Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **J Appl Oral Sci.** v. 25, n. 1, p. 42-52, 2017.
- OZAWA, S. *et al.* Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 137-143, Jan. 2002.
- PENARROCHA-DIAGO, M. *et al.* Transcrestal sinus lift and implant placement using the sinus balloon technique. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 17, n. 1, p. e122-128, Jan. 2012.
- PEREIRA, R. D. S. *et al.* Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 19, n. 5, p. 867-875, Oct. 2017.
- QUEIROZ, T. P. *et al.* Compromised primary implant stability. **J. Craniofac. Surg.**, v. 23, n. 5, p. e524-e528, Sept. 2012.
- RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 6, p. 798-805, Jun 2015.
- RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON 3RD, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 279-302, Jun. 2002.
- SANTOS, F. A. *et al.* Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 12, n. 1, p. 18-25, Mar. 2010.

SCHEPERS, E. *et al.* Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. **J Oral Rehabil**, v. 18, n. 5, p. 439-452, Sep 1991.

SCHEPERS, E. J. *et al.* Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dent**, v. 2, n. 3, p. 151-156, Fall 1993.

SHAPURIAN, T. *et al.* Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 21, n. 2, p. 290-297, Mar./Apr. 2006.

SJOSTROM, M. *et al.* Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis. A clinical study from implant placement to 6 months of loading. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 34, n. 1, p. 45-51, Jan. 2005.

STENTZ, W. C. *et al.* Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Histologic analysis. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 10, p. 933-949, Oct. 1997.

TABATA, L. F. *et al.* Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 26, n. 3, p. 482-491, May/Jun. 2011.

TAGHIPOUR, T. *et al.* Mild synthesis of a Zn(II) metal organic polymer and its hybrid with activated carbon: Application as antibacterial agent and in water treatment by using sonochemistry: Optimization, kinetic and isotherm study. **Ultrason. Sonochem.**, v. 41, p. 389-396, Mar. 2018.

TAO, Z. S. *et al.* Single-dose local administration of parathyroid hormone (1-34, PTH) with β -tricalcium phosphate/collagen (β -TCP/COL) enhances bone defect healing in ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab.** v. 37, n. 1, p. 28-35, 2019.

VAN POTTELBERGH, I.; GOEMAERE, S.; KAUFMAN, J. M. Bioavailable estradiol and an aromatase gene polymorphism are determinants of bone mineral density changes in men over 70 years of age. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, n. 7, p. 3075-3081, Jul. 2003.

VANDERSCHUEREN, D. *et al.* Androgens and bone. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 389-425, Jun. 2004.

VEIS, A. A. *et al.* Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles. **Implant Dent.**, v. 15, n. 4, p. 386-394, Dec. 2006.

YAMAZAKI, M. *et al.* Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 87, n. 4, p. 411-418, Apr. 1999.

Tabelas

TABELA 1 - Grupos experimentais de acordo com o experimento e teste do biomaterial

Grupos	
CLOT	Grupo em que será criado o defeito peri-implantar e instalado implante sem utilização de biomaterial (coágulo).
BG	Grupo em que será criado o defeito peri-implantar e instalado implante com utilização do BioGran®.
BGPTH	Grupo em que será criado o defeito peri-implantar e instalado implante com utilização do BioGran® associado ao PTH 1-34 tópica.

Fonte: Autor

TABELA 2 - Distribuição dos grupos experimentais, mediante as análises de tecido calcificado e descalcificado, microCT, Biomecânica, RT-PCR e análise ultraestrutural da interface osso/biomaterial.

		CALCIFICADO	DESCALCIFICADO	MICROCT	BIOMECÂNICA RT-PCR	ULTRAESTRUTURAL	N TOTAL
SHAM	COAG (Coágulo)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	-	16
	BG (BioGran®)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Animais	24
	BG-PTH (BioGran®+PTH)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Animais	24
ORQ	COAG (Coágulo)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	-	16
	BG (BioGran®)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Animais	24
	BG-PTH (BioGran®+PTH)	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Tíbia Dir.	8 Tíbia Esq.	8 Animais	24

Fonte: Autor

TABELA 3 - Scores obtido nas imunomarcações das proteínas WNT, Beta Catenina, osteocalcin, and TRAP nos diferente grupos experimentais.

<i>Proteínas</i>	SHAM			ORQ		
	<i>CLOT</i>	<i>BG</i>	<i>BGPTH</i>	CLOT	BG	BGPTH
WNT	1	2	1	1	2	2
Beta Catenina	1	2	2	2	2	2
OC	1	3	2	1	2	2
TRAP	1	2	2	2	2	3

Fonte: Autor

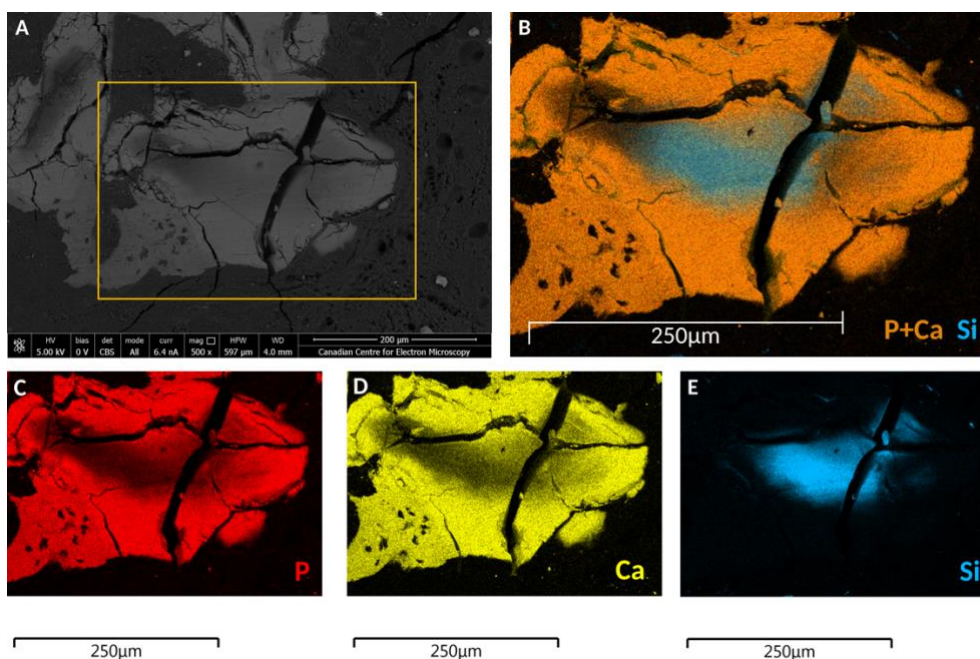
Figuras

FIGURA 1 – Homogeneização do BioGan® com a Teriparatida por meio do processo de sonoquímica para obtenção do biomaterial utilizado na presente pesquisa



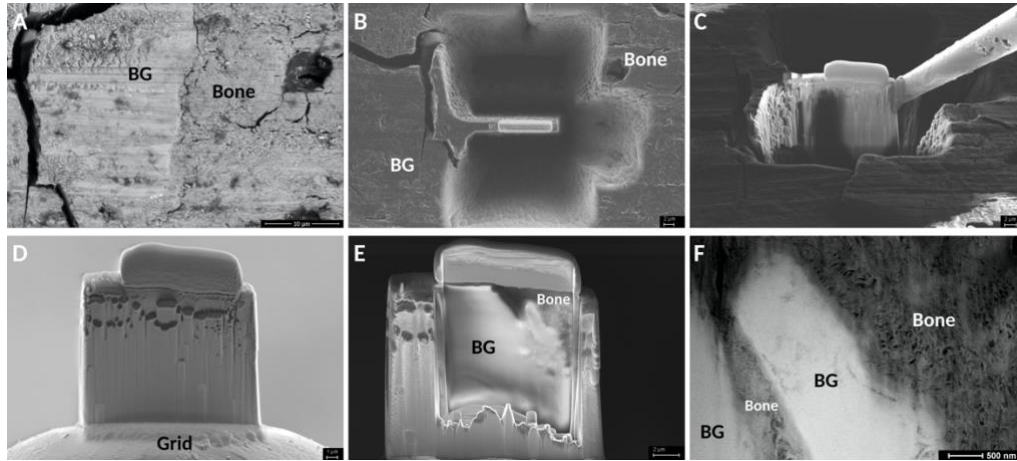
Fonte: Autor

FIGURA 2A - Imagem MEV retroespalhada da partícula de biomaterial e osso; **B** Mapeamento do local predefinido pela sobreposição de todos elementos isolado em que a cor laranja simboliza presença de P e Ca, e azul ao centro Si; **C** Para o mapeamento de Fósforo na partícula do biomaterial e osso adjacente foi utilizado a cor vermelha; **D** Mapeamento isolado de Cálcio utilizando a cor amarela; **E** Mapeamento de Sílica utilizando a cor Azul.



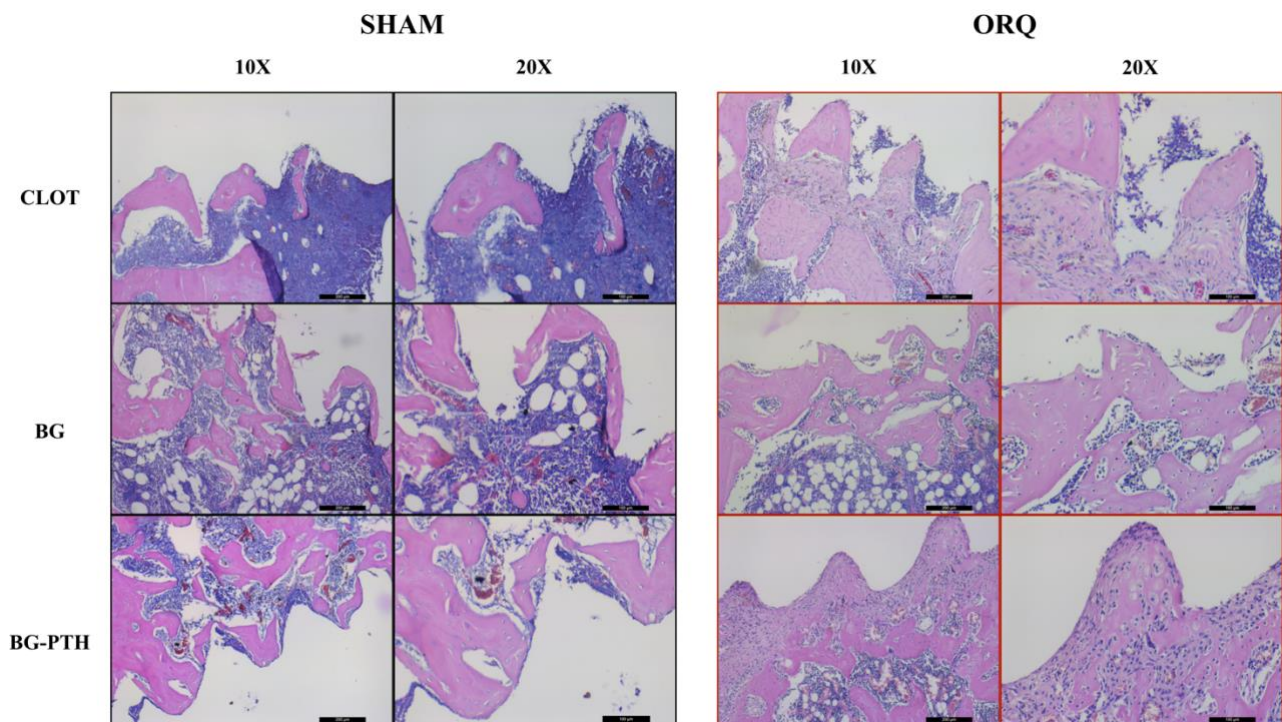
Fonte: Autor

FIGURA 3A - Imagem MEV retroespalhada do biomaterial (BG) e osso; **B** MET pelo FIB, incluindo trincheiras cortadas em ambos os lados da área de interesse, protegidas por deposição de tungstênio; **C** levantamento da amostra; **D** conexão à grade MET; **E** afinamento da amostra; **F** HAADF STEM imagem da amostra final mostrando osso e biomaterial (BG).



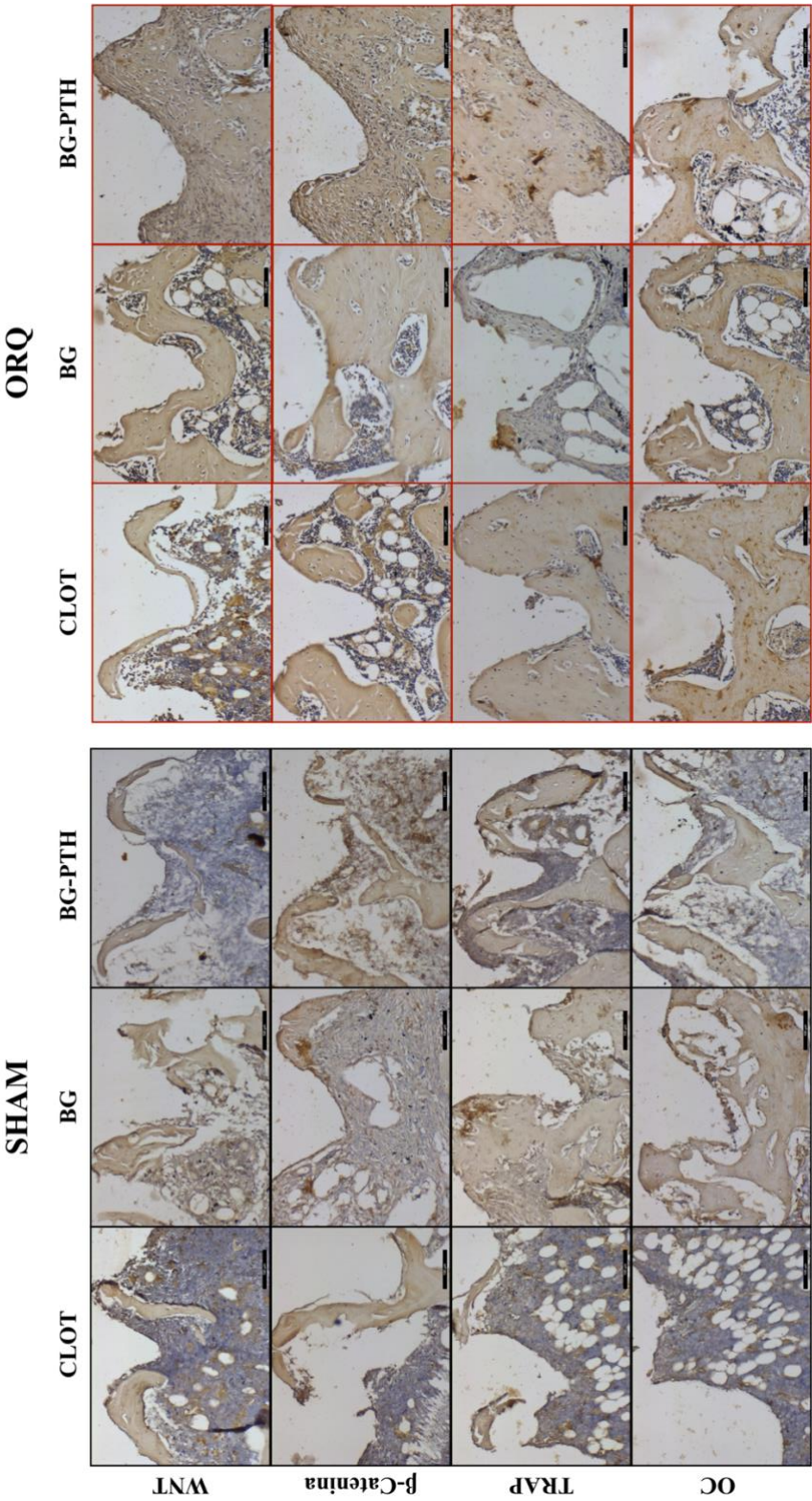
Fonte: Autor

FIGURA 4 – Imagens histológicas do reparo peri-implantar do animais referentes aos grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BGPTH (objetiva, 10X e 20X).



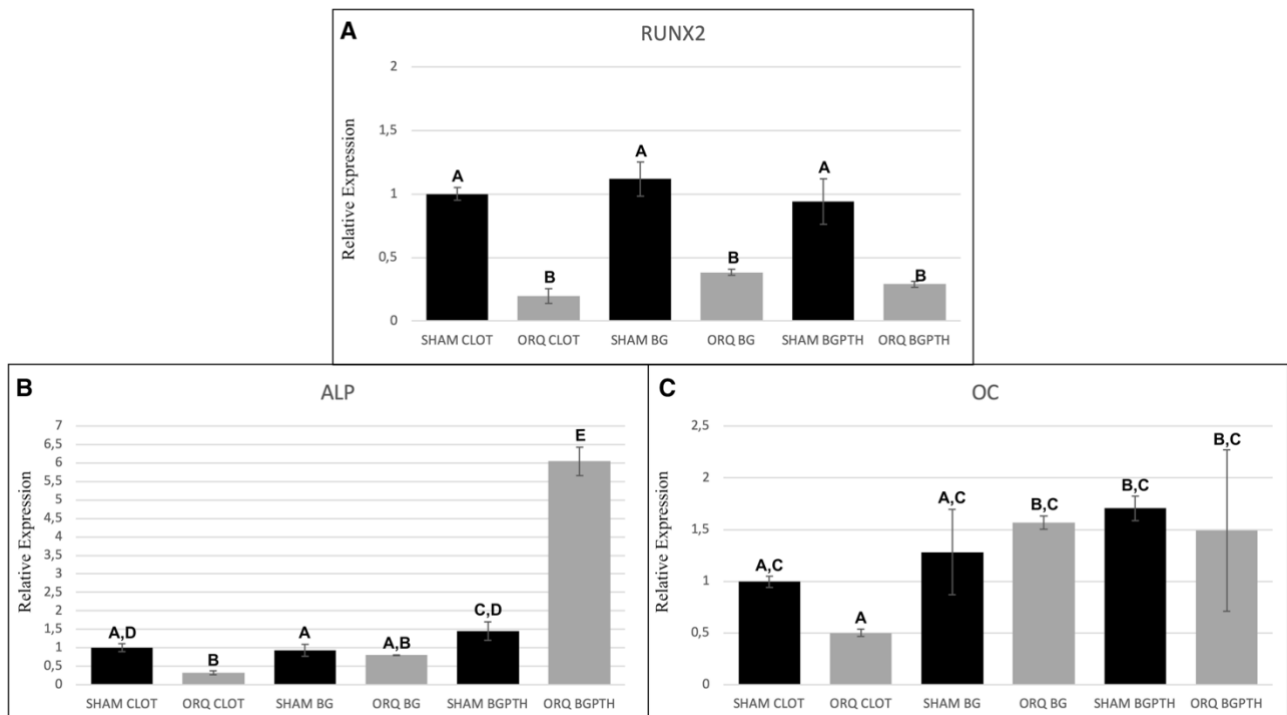
Fonte: Autor

FIGURA 5 – Imunoistoquímica utilizando as proteínas WNT, Beta Catenina, ALP, TRAP e OC no período de 60 dias. Imunomarcações dos grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BTPTH. (Objetiva, 20X).



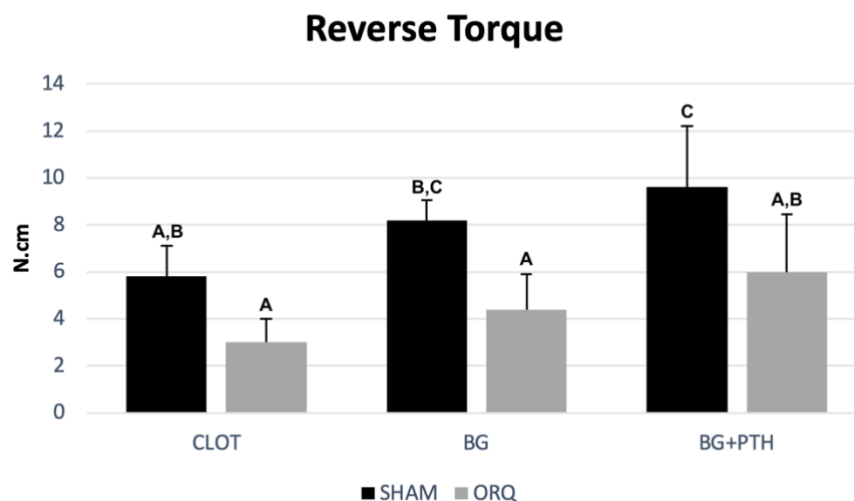
Fonte: Autor

FIGURA 6 – Expressão genética relativa de RUNX2 (A), ALP (B), e OC (C) no período de 60 dias no grupos SHAM e ORQ – CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).



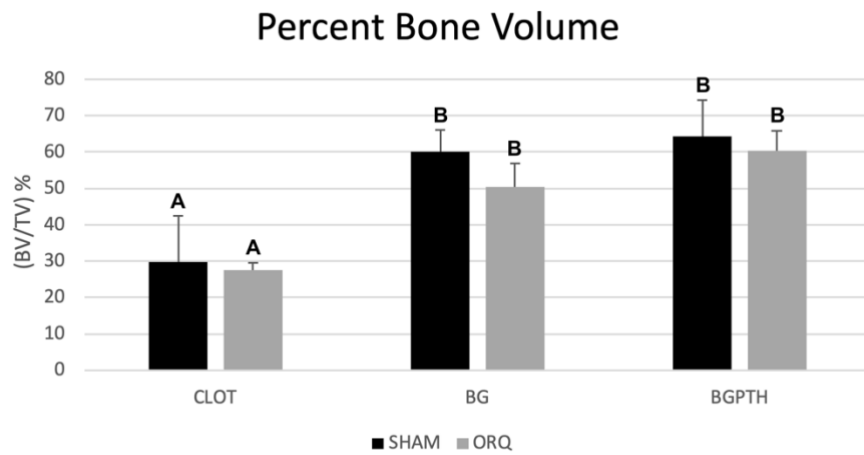
Fonte: Autor

FIGURA 7 – Resultado do torque reverso dos grupos ORQ e SHAM, avaliação da comparação dos grupos preenchidos com Coagulo, BioGran® e BioGran® PTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).



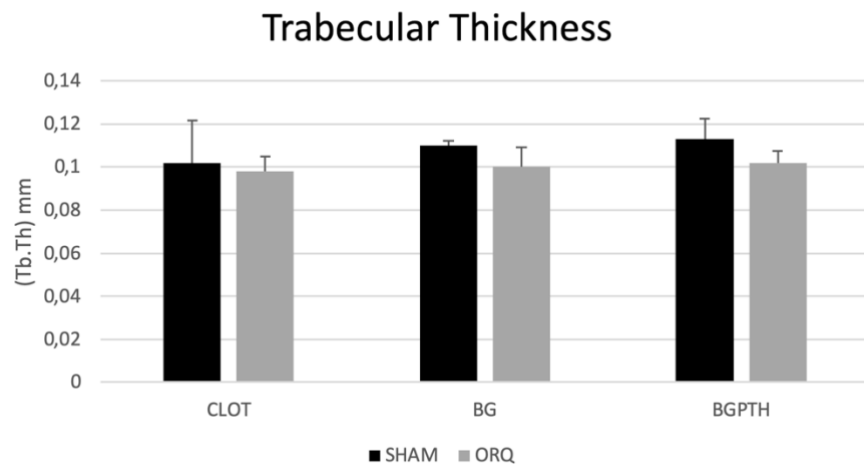
Fonte: Autor

FIGURA 8 – Quantificação do percentual de volume ósseo para SHAM e ORQ, na comparação dos grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferente = $p < 0,05$).



Fonte: Autor

FIGURA 9 – Quantificação da espessura trabecular. Valores aproximados para SHAM e ORQ - COAG, BG e BGPTH (Tukey, $p > 0,05$).



Fonte: Autor

FIGURA 10 – Quantificação da separação das trabéculas. Valor maior para SHAM e ORQ CLOT e menor para SHAM e ORQ BG e BGPTH (para todas comparações, $p > 0,05$).

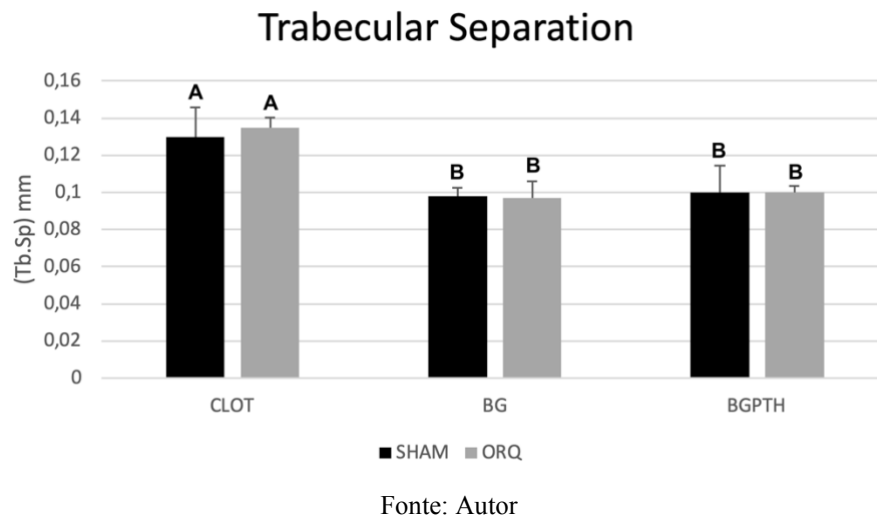


FIGURA 11 – Quantificação do número de trabécula. Valor menores para SHAM e ORQ CLOT e maiores para SHAM e ORQ BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).

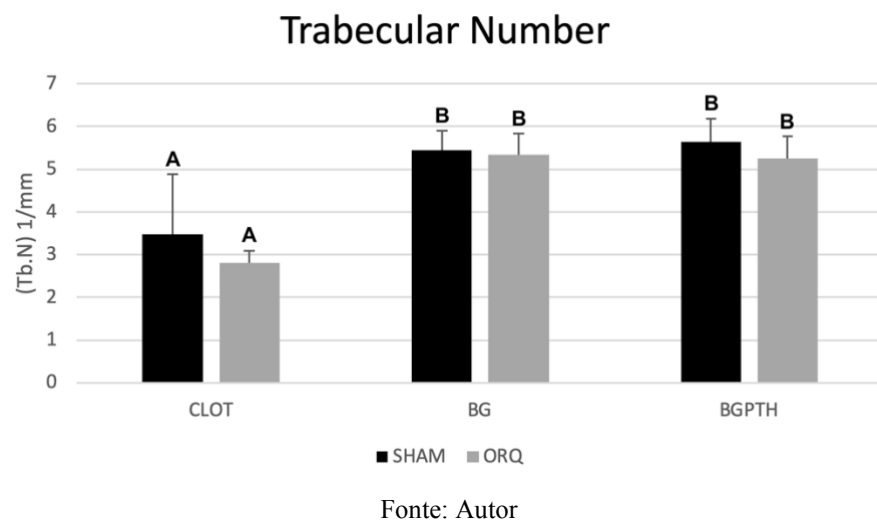


FIGURA 12 – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para os grupos ORQ e SHAM CLOT e menos poroso para ORQ e SHAM BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).

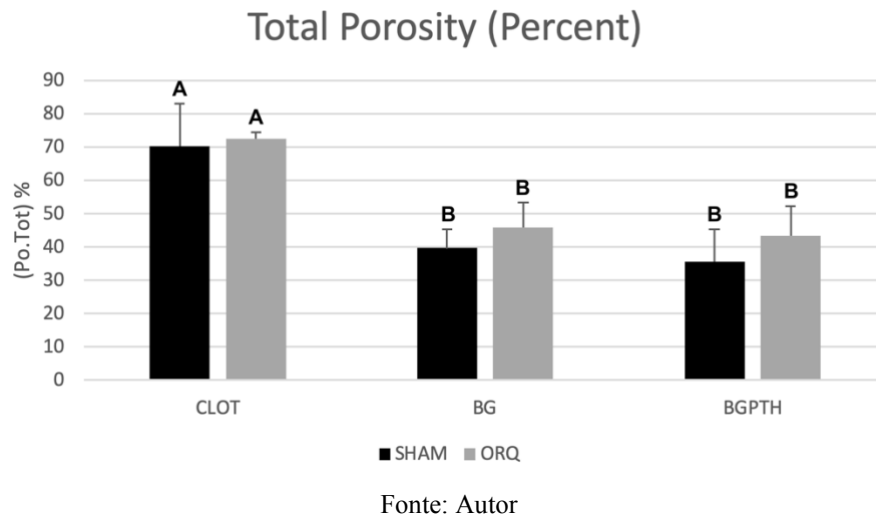


FIGURA 13 – Quantificação a extensão linear de contato osso/implante (BIC). Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).

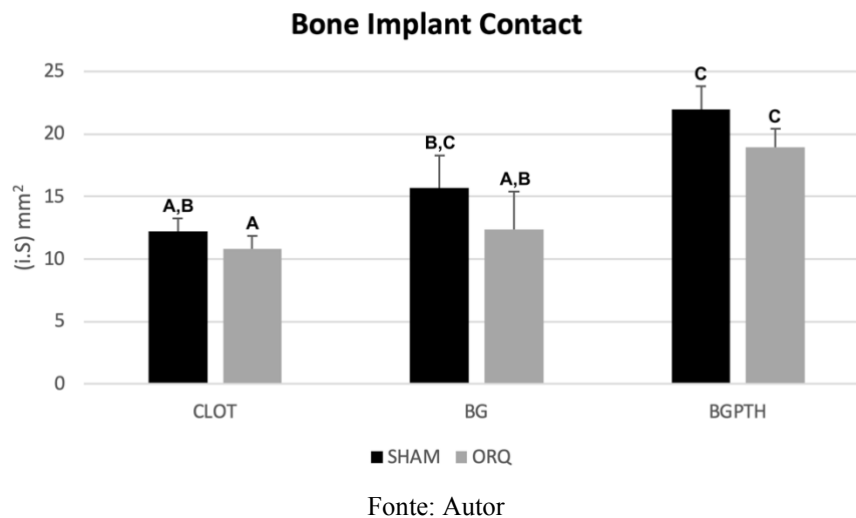
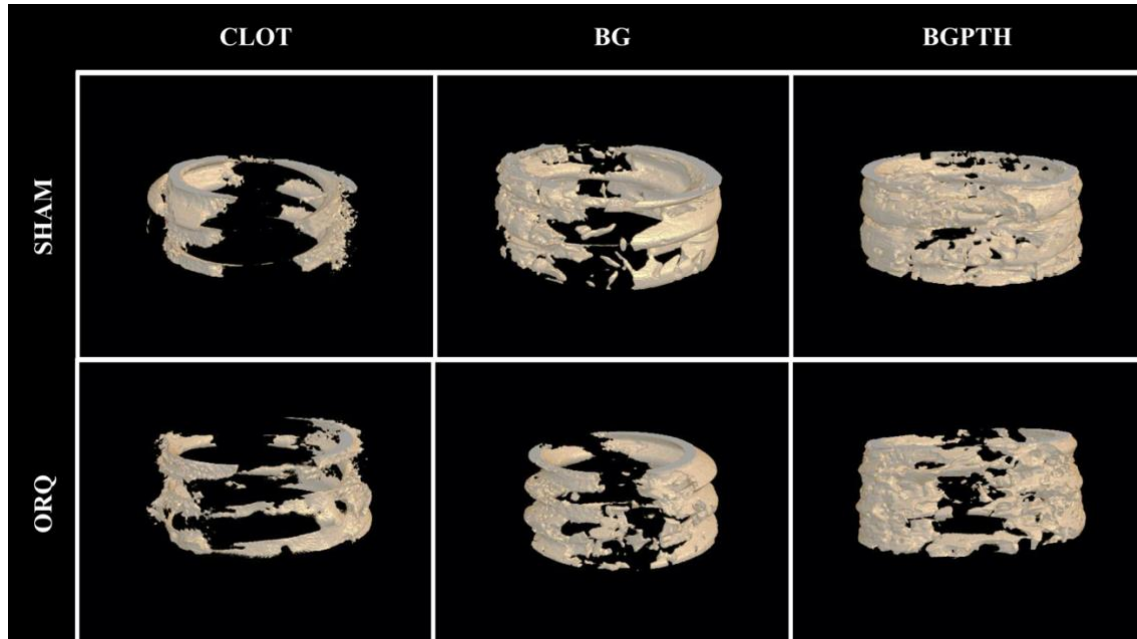
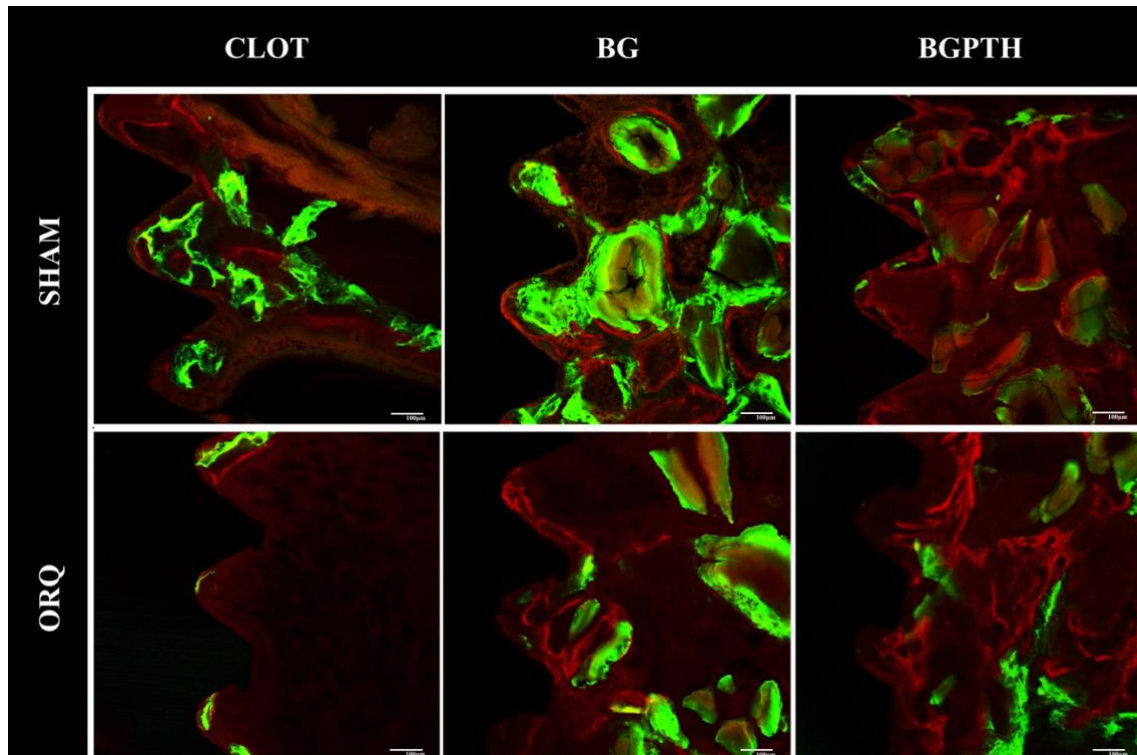


FIGURA 14 – Renderização tridimensional do osso formado entorno das espiras nos diferentes grupos experimentais realizado através da microtomografia 3D.



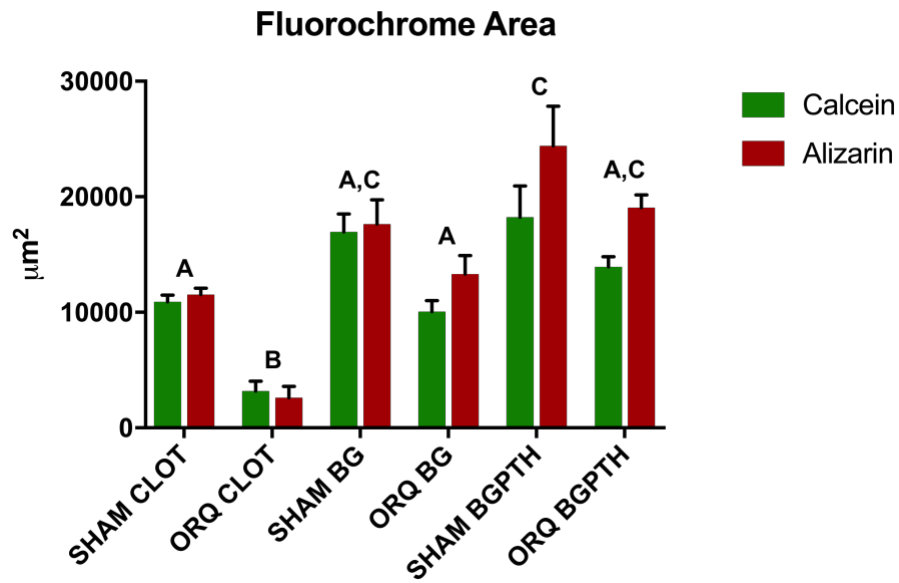
Fonte: Autor

FIGURA 15 – Marcação de calceína (verde) e alizarina (vermelho) das linhas fluorescentes na matriz de cálcio, demonstrando a dinâmica do osso peri-implantar do grupos experimentais.



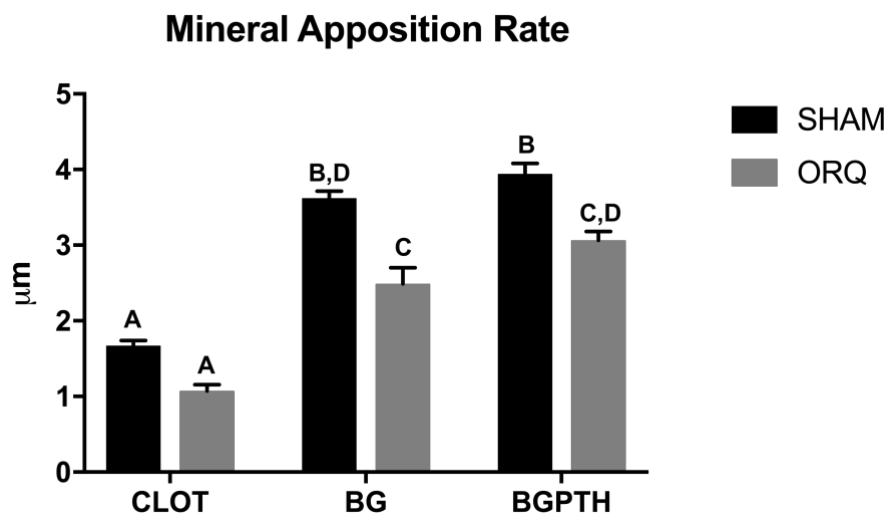
Fonte: Autor

FIGURA 16 – Quantificação dos fluorocromos calceína (verde) e alizarina (vermelho). Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).



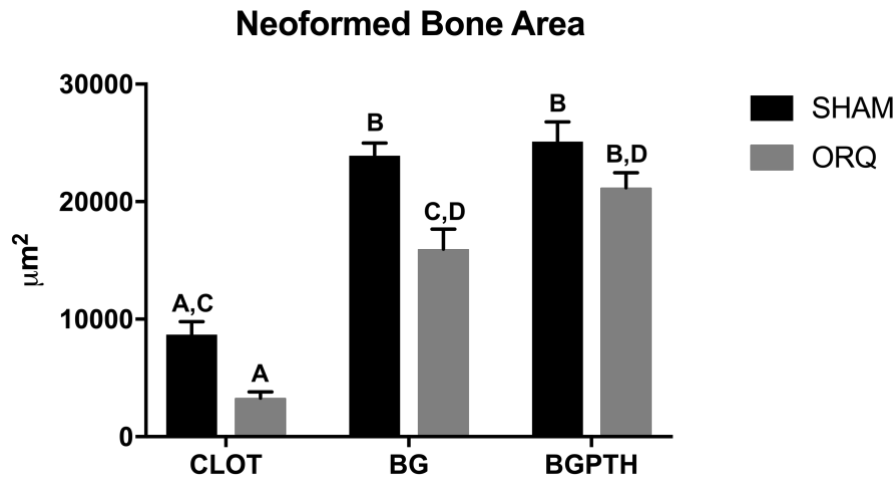
Fonte: Autor

FIGURA 17 – Valores referentes a taxa de aposição mineral óssea diária. Comparação de SHAM e ORQ nos diferente grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).



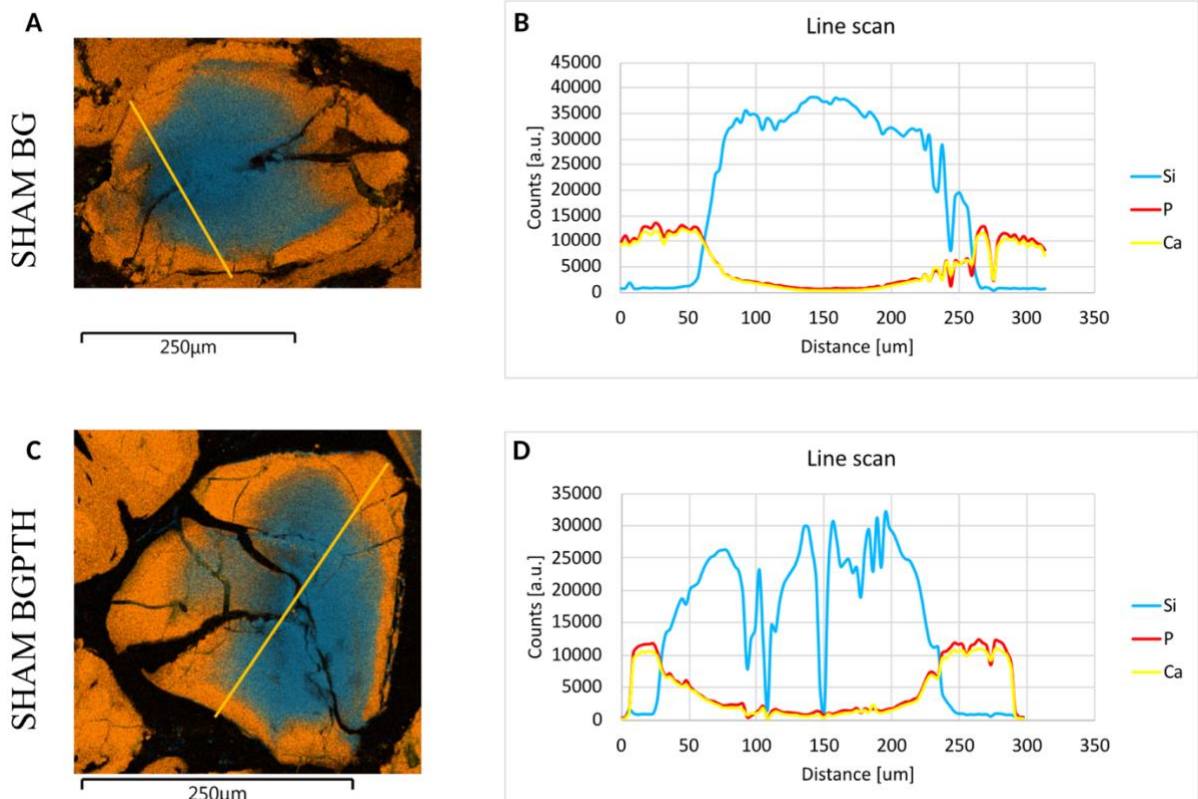
Fonte: Autor

FIGURA 18 – Valores referentes a área óssea neoformada. Comparação de SHAM e ORQ nos diferentes grupos CLOT, BG e BGPTH (Letras diferentes = $p < 0,05$).



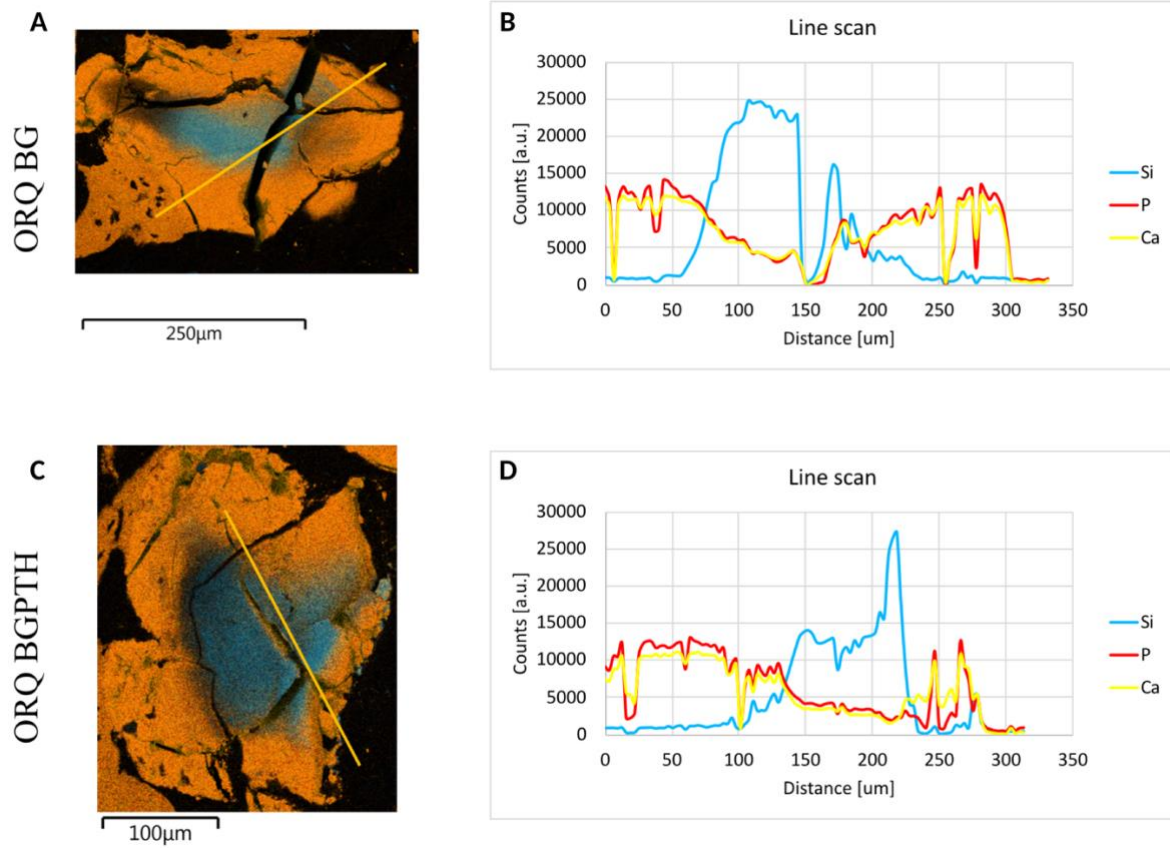
Fonte: Autor

FIGURA 19 – **A e B:** Representação elemental do biomaterial dos grupos SHAM BG e BGPTH com predominância de sílica no interior da partícula e Ca e P na extremidade (fina camada); **B e D:** análise linear da partícula de biomaterial com predominância de Si em maior extensão e contagem.



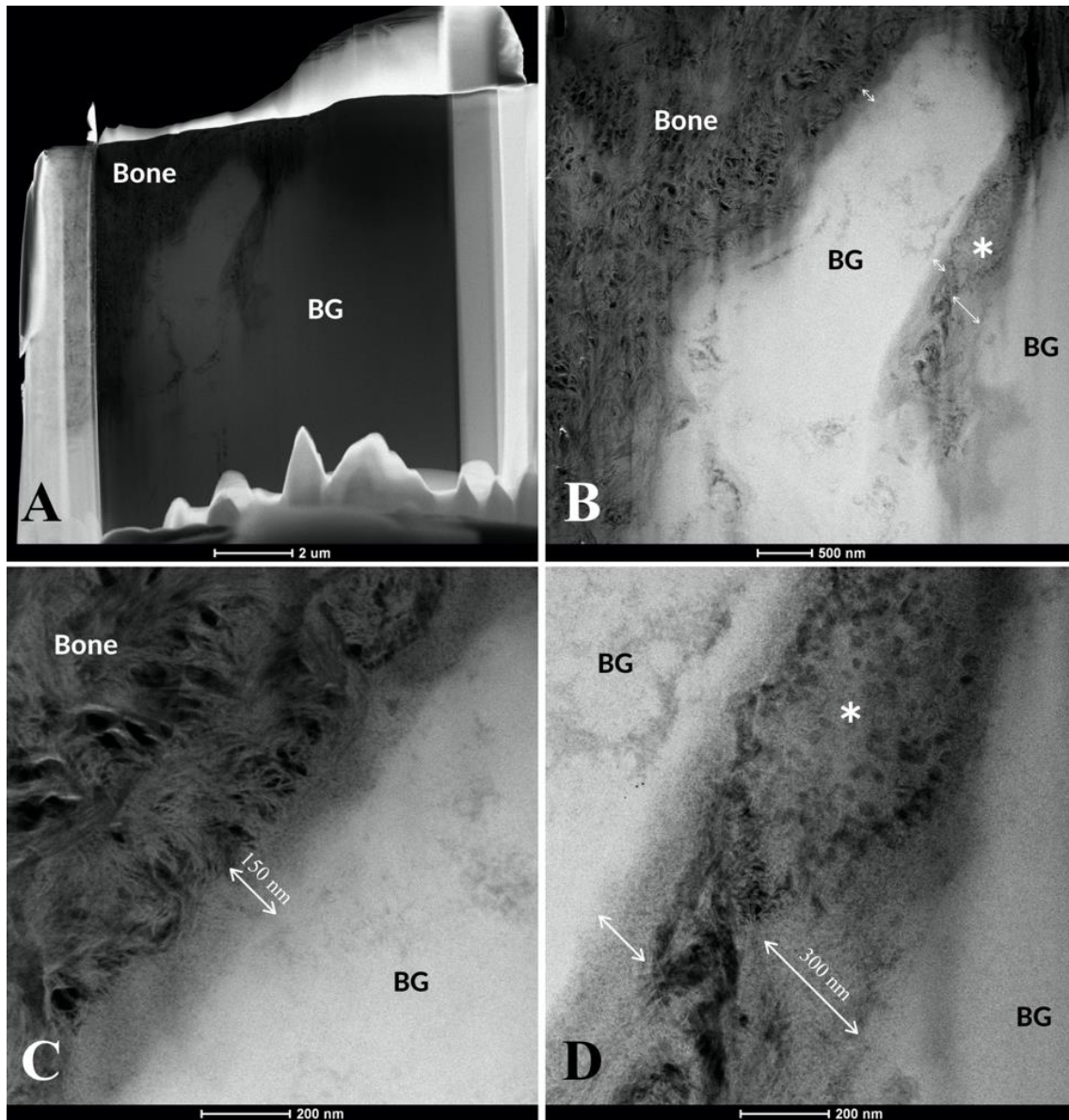
Fonte: Autor

FIGURA 20 – A e B: Representação elementar do biomaterial dos grupos ORQ BG e BGPTH com quantidades similares de Si; Ca e P; **B e D:** análise linear da partícula de biomaterial com maior extensão de Ca e P, e contagem de Si maior no grupo BG em comparação a CA e P, porém semelhante no grupo BGPTH.



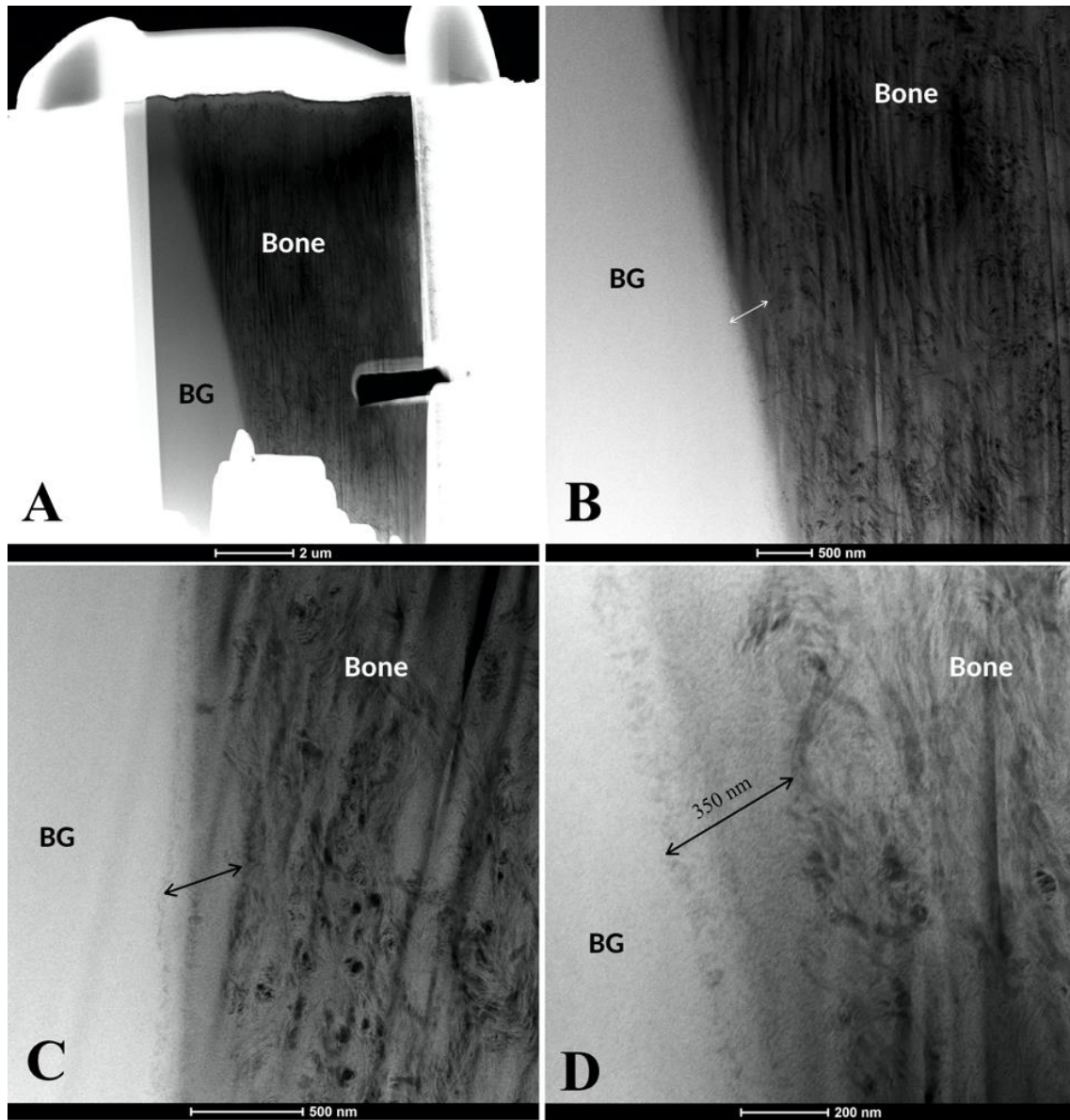
Fonte: Autor

FIGURA 21 – Amostras do grupo SHAM BG; **A**: ao remover do FIB; **B**, **C** e **D**: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- Biogran; Bone – Osso; * - Região em condição de neoformação óssea.



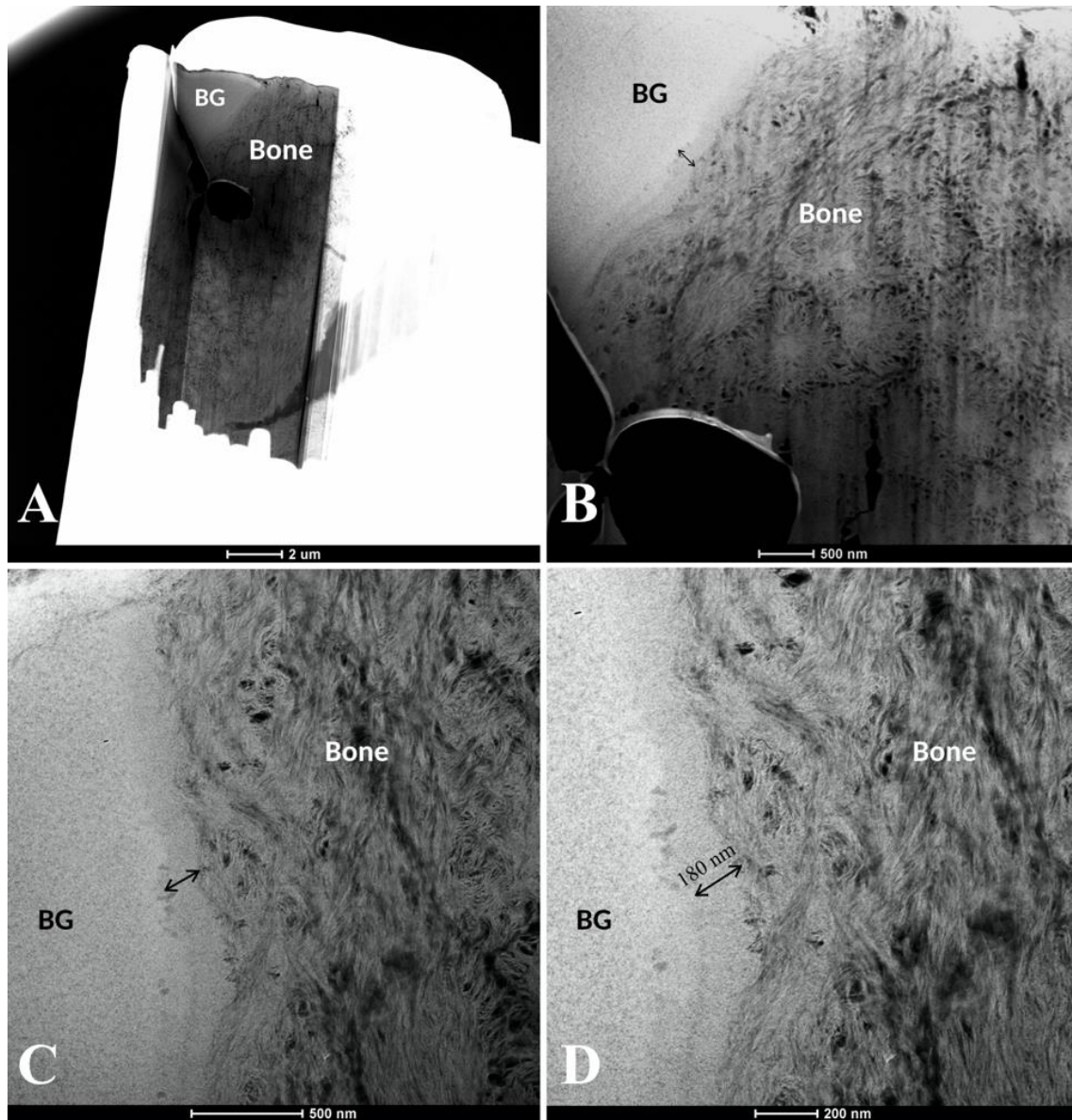
Fonte: Autor

FIGURA 22 – Amostras do grupo SHAM BGPTH; **A**: ao remover do FIB; **B**, **C** e **D**: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferente magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG-BioGran®; Bone – Osso.



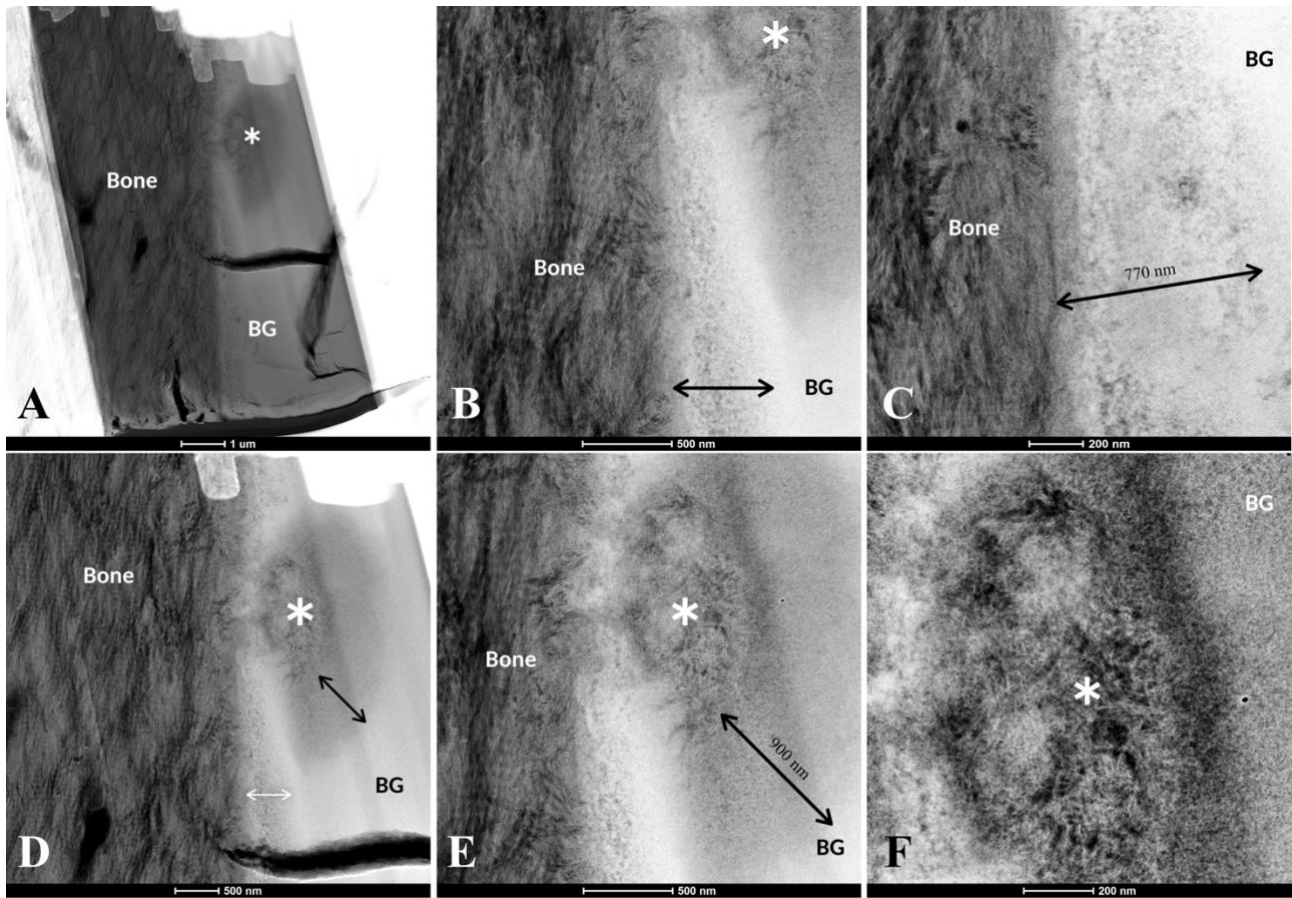
Fonte: Autor

FIGURA 23 – Amostras do grupo ORQ BG; **A**: ao remover do FIB; **B**, **C** e **D**: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferentes magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG- BioGran®; Bone – Osso.



Fonte: Autor

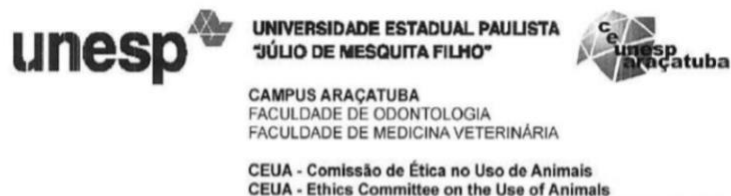
FIGURA 24 – Amostras do grupo ORQ BGPTH; **A**: ao remover do FIB; **B, C, D, E e F**: avaliação pelo MET (HAADF) nas diferentes magnitudes e regiões da interface osso/biomaterial. BG-BioGran®; Bone – Osso; * - Região em condição de neoformação óssea.



Fonte: Autor

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito do PTH tópica, incrementado ao Biogran® nos defeitos ósseos em ratos submetidos à orquiectomia", Processo FOA nº 00199-2017, 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 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 04 de Março de 2019.

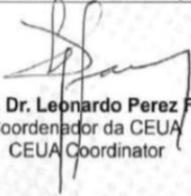
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Abril de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of topical PTH, increased to Biogran® on bone defects in orchietomized rats", Protocol FOA nº 00199-2017, 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 April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 04, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 04, 2019.


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