

FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio

**Araçatuba – SP
2021**

FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio

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

**Araçatuba – SP
2021**

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

B333c Batista, Fábio Roberto de Souza.
Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio / Fábio Roberto de Souza Batista. - Araçatuba, 2021
67 f. : il.; tab.

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

1. Osteoporose 2. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos 3. Interface osso-implante 4. Osseointegração 5. Óxido nítrico I. T.

Black D7
CDD 617.6

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

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.**

À minha família, Maria Aparecida de Souza Batista, Guido José Batista e Victor Eduardo de Souza Batista, pelo apoio, sem medir esforços para a concretização deste sonho. Sem minha família esta conquista seria impossível. Agradeço todo o dia por tê-los ao meu lado. Vocês são meus exemplos de amor incondicional.

À minha mãe, Maria Aparecida de Souza Batista, pelo exemplo de mulher, pelo amor incondicional, pelo abraço carinhoso nos momentos de angústia, além de todos os conselhos nos momentos de incerteza que vivenciei. Te amo mãe!

Ao meu pai, Guido José Batista, por todo o incentivo na profissão, pela oportunidade concedida para poder crescer, além dos valores éticos e morais para minha formação. Te amo pai!

Ao meu irmão, Victor Eduardo de Souza Batista, pelo exemplo de dedicação e esforço, por ser meu mentor durante essa trajetória na pós-graduação, além de todos os conselhos nos momentos de incerteza que vivenciei. Te amo irmão!

À minha namorada, Jaqueline Silva dos Santos. Meu amor, quero te agradecer por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Nós dois caminhamos juntos em parceria, e é muito bom poder contar com alguém, é melhor ainda quando esse alguém é você. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por me dar esta vida plena de verdade e alegria.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte de toda a trajetória desde o meu ingresso ao curso de Pós Graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

À minha Orientadora

Minha orientadora, **Professora Adjunta Roberta Okamoto**, eu agradeço por todas as oportunidades e apoio ao longo do meu mestrado e doutorado. Minha admiração e respeito crescem a cada dia que passa, devido à sua capacidade admirável de liderar nosso grupo. Uma líder que corrige sem ofender e orienta sem humilhar, de fato, um exemplo que levarei para minha vida acadêmica. Seu apoio e conselhos têm permitido meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

Ao meu Coorientador

Ao meu coorientador, **Professor Adjunto Paulo Noronha Lisboa Filho**, eu agradeço por todas as lições. Expresso minha sincera admiração e respeito ao senhor.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Prof. Dr. Francisley Ávila Campos, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Daniela Ponzoni.**

Aos docentes, funcionários, estagiários e pós-graduandos do Departamento de Ciências Básicas, Diagnóstico e Cirurgia.

Aos professores da disciplina de Anatomia, **Prof. Titular José Américo de Oliveira, Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo e Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin.**

Aos professores da disciplina de Histologia **Prof. Edilson Ervolino** e **Prof. Mariza Akemi Matsumoto**, pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos.

Aos funcionários e colegas da disciplina de Anatomia: Senhores **José Ari Gualberto Junqueira** e **Arnaldo César dos Santos**, por todo o suporte.

À empresa Emfils Itu-SP pela fabricação e fornecimento dos implantes.

À senhora Márcia Sirlene Zardin Graeff (CIP, FOB-USP) pela atenção e disponibilidade.

À senhora Dirce Colli Boatto (FOA-UNESP) por toda ajuda durante o processamento laboratorial.

Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado (**processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011**).

Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e Ciências Básicas. Meu muito Obrigado.

As Alunas de iniciação Científica da nossa equipe, pela disponibilidade, amizade, auxílio, boa vontade e por tornar toda a parte da execução do trabalho mais fácil e agradável, meu muito obrigado.

Aos alunos da graduação e pós-graduação, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado, auxiliando no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

CAPES

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

CNPq

Processo nº 140050/2019-1, Centro Nacional de Qualificação Profissional (CNPq).

FAPESP

Processo nº 2018/03114-0, Auxílio a Pesquisa Regular

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 Diagnóstico e Cirurgia. Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp. Profa.Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Prof.Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho.

Aos Professores da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Prof. Dr. Liogi Iwaki Filho e Prof. Dr. Ângelo José Pavan.

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

Sigmund Freud

Batista FRS. Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas a deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2021.

RESUMO

Objetivo: caracterizar o processo de reparo ósseo peri-implantar em maxilas de ratas ovariectomizadas com síndrome metabólica induzida por dieta de cafeteria, tratadas com risedronato e instalação de implantes funcionalizados com $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY). **Materiais e métodos:** os testes *in vitro* realizados na Fase 1 avaliou as propriedades biológicas e físico-químicas da melhor concentração da TERPY frente às respostas osteogênicas, para a funcionalização dos implantes pela técnica de LbL. A realização de experimentos *in vivo* na Fase 2 avaliou o efeito da superfície funcionalizada durante o reparo ósseo peri-implantar. Para isso, 48 ratas *Wistar* foram divididas em: SHAM CONV (n=8), OVX SM CONV (n=8), OVX SM RIS CONV (n=8), SHAM TERPY (n=8), OVX SM TERPY (n=8) e OVX SM RIS TERPY (n=8). Em t=0, as ratas foram submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) e à cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX); após a recuperação da cirurgia, os animais receberam a dieta de cafeteria (SM). Passados 30 dias (t=30), o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio (0,7 mg/kg/semana) (RIS) ou solução salina (0,3 ml), via gavagem, foi iniciado e realizado até o momento da eutanásia. Sessenta dias após o início do tratamento medicamentoso (t=90), a cirurgia de exodontia do primeiro molar superior foi realizada junto à instalação imediata dos implantes de forma bilateral (CONV ou TERPY). Quatorze dias após a cirurgia de instalação dos implantes (t=104), todos os grupos experimentais receberam a injeção intramuscular do fluorocromo calceína (20 mg/kg) e após 10 dias (t=114), do fluorocromo vermelho de alizarina (25 mg/kg). Aos 28 dias pós-operatórios (dia da eutanásia, t=118), os animais foram anestesiados e, nas maxilas do lado direito, os implantes foram submetidos ao torque reverso e imediatamente após a remoção dos implantes, foi realizada a coleta do tecido ósseo para análise de PCR tempo real para avaliação da expressão relativa de ALP, iBSP, OCN, OPG, RANKL, TRAP e VEGF, seguido da eutanásia dos animais; as maxilas do lado esquerdo foram coletadas para a análise de Micro-CT (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e i.S) e, após o escaneamento, as mesmas passaram pelo processamento para análise da dinâmica óssea por fluorocromos (MAR e ELCOI). Os dados foram submetidos à análise estatística, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Fase 1: poucas diferenças foram observadas entre as duas concentrações avaliadas e assim, a menor

concentração do fármaco foi selecionada (10 μ M). Fase 2: os implantes funcionalizados com a TERPY apresentaram os maiores valores absolutos de torque de remoção para todos os grupos e com diferença estatística para OVX SM TERPY (p=0,0402). A associação sistêmica entre o risedronato e a TERPY em ratas ovariectomizadas (OVX SM RIS TERPY) demonstrou expressão aumentada para iBSP e equilíbrio entre OPG e RANKL, corroborando com os dados obtidos para MAR (p=0,0052) e com os parâmetros de BV/TV, Tb.Th e i.S da análise microtomográfica para esse mesmo grupo. Conclusão: o desempenho clínico dos implantes funcionalizados com TERPY foi favorável, e, quando associado à administração sistêmica de risedronato de sódio, os resultados se tornam mais promissores.

Palavras-chave: Osteoporose. Osteonecrose por bifosfonatos. Interface osso-implante. Osseointegração. Óxido nítrico.

Batista FRS. Characterization of peri-implant bone tissue against the use of nitric oxide for surface functionalization of implants installed in the maxilla of rats induced to estrogen deficiency and metabolic syndrome treated with risedronate sodium [tese]. Araçatuba: College of Dentistry - State University Paulista; 2021.

ABSTRACT

Objective: characterize the peri-implant bone tissue repair process in maxilla of ovariectomized rats with metabolic syndrome induced by cafeteria diet, treated with risedronate and through placement the implants functionalized with [Ru(terpy)(bdq)NO] $^{3+}$ (TERPY). Materials and methods: *in vitro* tests performed in Phase 1 evaluated the biological and physicochemical properties of the better concentration of TERPY against osteogenic responses, for the functionalization of implants using the LbL technique. *In vivo* experiments in Phase 2 evaluated the effect of functionalized surface during peri-implant bone repair. For this, 48 female rats were divided: SHAM CONV (n=8), OVX SM CONV (n=8), OVX SM RIS CONV (n=8), SHAM TERPY (n=8), OVX SM TERPY (n=8) and OVX SM RIS TERPY (n=8). At t=0, the rats underwent unreal surgery (SHAM) and bilateral ovariectomy surgery (OVX); after recovery from surgery, animals received cafeteria diet (SM). After 30 days (t=30), drug treatment with risedronate sodium (0.7 mg/kg/week) (RIS) or saline solution (0.3 ml), via gavage, was started and sustained out until the time of euthanasia. Sixty days after the start of drug treatment (t=90), the maxillary first molar extraction surgery was performed followed by the immediate installation of the implants bilaterally (CONV or TERPY). Fourteen days after implant placement surgery (t=104), all experimental groups received intramuscular injection of the fluorochrome calcein (20 mg/kg) and after 10 days (t=114), the red fluorochrome alizarin (25 mg/kg). After 28 postoperative days (day of euthanasia, t=118), the animals were anesthetized and, in the maxillary on the right side, the implants were subjected to reverse torque and immediately after removal of the implants, bone tissue was collected for real-time PCR analysis to measure the relative expression of ALP, iBSP, OCN, OPG, RANKL, TRAP e VEGF, followed by euthanasia of animals; the left side maxillary were collected for Micro-CT analysis (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e i.S) and, after scanning, they underwent processing for analysis of bone dynamics by fluorochromes (MAR and ELCOI). Data values were subjected to statistical analysis, with a significance level of 5% (p<0.05). Results: Phase 1: few differences were observed between the two concentrations evaluated and thus, the lowest drug concentration was selected (10 μ M). Phase 2: the implants functionalized with TERPY presented the highest absolute values of removal torque for all

groups and with statistical difference for OVX SM TERPY ($p=0.0402$). The systemic association between risedronate and TERPY in ovariectomized rats (OVX SM RIS TERPY) showed increased expression for iBSP and balance between OPG and RANKL, corroborating the data obtained for MAR ($p=0.0052$) and with the parameters BV/TV, Tb.Th and i.S of the microtomographic analysis for this same group. Conclusion: the clinical performance of implants functionalized with TERPY was favorable, and when associated with the systemic administration of risedronate sodium, the results become more promising.

Keywords: Osteoporosis. Bisphosphonate osteonecrosis. Bone-implant interface. Osseointegration. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Delineamento experimental - Experimentos <i>in vivo</i>	24
Figura 2.	Cirurgia de Exodontia	35
Figura 3.	Cirurgia para instalação dos implantes imediatos	36
Figura 4.	MEV-EDS	48
Figura 5.	Curva de calibração para TPY (-)	49
Figura 6.	Peso corporal em T1, T2 e T3	50
Figura 7.	Glicemia em T1, T2 e T3	51
Figura 8.	Índice de Lee em T1, T2 e T3	52
Figura 9.	Parâmetros da análise de Micro-CT	59
Figura 10.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para todos os grupos e suas respectivas superfícies	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantidade de alimento dada para os animais por dia	33
Tabela 2.	Quantificação de TERPY adsorvida na superfície do implante	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Absorbância por MTT	44
Gráfico 2.	Viabilidade celular	45
Gráfico 3.	Nódulos de mineralização	46
Gráfico 4.	Genotoxicidade celular	47
Gráfico 5.	Biomecânica	53
Gráfico 6.	PCR em tempo real para ALP	54
Gráfico 7.	PCR em tempo real para iBSP	55
Gráfico 8.	PCR em tempo real para OCN	55
Gráfico 9.	PCR em tempo real para OPG	56
Gráfico 10.	PCR em tempo real para RANKL	57
Gráfico 11.	PCR em tempo real para TRAP	57
Gráfico 12.	PCR em tempo real para VEGF	58
Gráfico 13.	MAR	61
Gráfico 14.	ELCOI	62

LISTA DE ABREVIações

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
NO	Óxido nítrico
[Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	Complexo de rutênio doador de óxido nítrico
OVX	Ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia
TPY (-)	Terpy 10µM
TPY (+)	Terpy 100µM
LSMT	Laboratory of Study for Mineralized Tissue
PSS	Poliestireno sulfonado
TiO ₂	Óxido de titânio
α-MEM	Alfa com L-glutamina
SBR	Soro fetal bovino
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol
LbL	Layer-by-Layer
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
MET HRMET	Microscopia eletrônica de alta transmissão de alta resolução
UV-Vis	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível
KCl	Cloreto de potássio
CONV	Superfície de implante convencional
SHAM CONV	Ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
OVX SM CONV	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
OVX SM RIS CONV	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
SHAM TERPY	Ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)

OVX SM TERPY	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)
OVX SM RIS TERPY	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)
Ca ²⁺	Cálcio
P	Fósforo
PCR	Proteína C-reativa
ALP	Fosfatase alcalina
iBSP	Sialoproteína óssea
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
$\Delta\Delta CT$	Método CT comparativo
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
BV/TV	Volume ósseo
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
i.S	Superfície de intersecção
TIFF	Tagged Image File Format
MAR	Mineral Apposition Rate
ELCOI	Extensão linear de contato osso-implante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Experimentos preliminares	23
2.2 Caracterização biológica e físico-química dos discos de titânio	23
2.2.1 Preparo dos discos e concentrações	23
2.3 Experimentos <i>in vitro</i> para validação de concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	24
2.3.1 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	24
2.3.2 Determinação da viabilidade celular	25
2.3.3 Análise de formação de nódulos de mineralização	25
2.3.4 Genotoxicidade	25
2.4 Funcionalização dos implantes após a validação da TERPY	26
2.4.1 Funcionalização das superfícies dos implantes	26
2.4.2 Caracterização das superfícies por MEV-EDS	27
2.5 Procedimentos experimentais para quantificação da TERPY	27
2.5.1 Análise da quantificação de TERPY por espectroscopia na região do UV-Vis	27
2.6 Experimentos <i>in vivo</i>	29
2.7 Animais	29
2.8 Delineamento experimental	30
2.8.1 Castração bilateral - Ovariectomia	31
2.8.2 Ciclo estral	32
2.8.3 Tratamento medicamentoso	32
2.8.4 Dieta de cafeteria para indução da Síndrome Metabólica	33
2.8.5 Cirurgia de exodontia	34
2.8.6 Cirurgia para instalação dos implantes imediatos	35
2.8.7 Aplicação dos fluorocromos	37
2.8.8 Eutanásia	37
2.9 Análises – Maxila dividida – Lado direito	38
2.9.1 Análise Biomecânica – Torque reverso	38
2.9.2 Análise de PCR em tempo real	38
2.10 Análises – Maxila dividida – Lado esquerdo	40
2.10.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	40
2.10.2 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)	41
2.11 Análise estatística	43
3. RESULTADOS	44
3.1 Validação da concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	44
3.1.1 Viabilidade celular	44

3.1.2 Nódulos de Mineralização	45
3.1.3 Teste de micronúcleos	46
3.2 Seleção da melhor concentração de TERPY	47
3.3 Dados físico-químicos após seleção da TPY (-)	47
3.3.1 Caracterização das superfícies	47
3.3.2 Espectroscopia na região do UV-Vis	48
3.4 Experimentos <i>in vivo</i>	50
3.4.1 Síndrome metabólica	50
3.4.2 Peso	50
3.4.3 Glicemia	51
3.4.4 Índice de Lee	51
3.5 Análise Biomecânica – Torque reverso	53
3.6 Análise de PCR em tempo real	54
3.6.1 Fosfatase Alcalina (ALP)	54
3.6.2 Sialoproteína óssea (iBSP)	54
3.6.3 Osteocalcina (OCN)	55
3.6.4 Osteoprotegerina (OPG)	56
3.6.5 Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL)	56
3.6.6 Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico (TRAP)	57
3.6.7 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	58
3.7 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	59
3.8 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)	60
3.8.1 Taxa de Aposição Mineral Diária (MAR)	61
3.8.2 Extensão linear de contato osso-implante (ELCOI)	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	
ANEXO A	79
ANEXO B	80
ANEXO C	81

1 INTRODUÇÃO

O aumento do risco de alterações patológicas provocadas pela senilidade é intensificado pela perda da homeostasia do organismo em função das complexas transformações nos eixos hormonais reguladores do metabolismo, como a diminuição da secreção hormonal e perda de sensibilidade dos tecidos a estes [1-3].

O estrogênio desempenha influência sobre o *turnover* ósseo a partir da regulação direta sobre a proliferação de osteoblastos e inibição de osteoclastos [4,5]. No período pós-menopausa, o declínio dos níveis desse hormônio leva à deformação dessa dinâmica a partir do aumento da atividade osteoclástica, excedendo os níveis normais de reabsorção e como consequência, a acelerada perda de massa óssea e aumento do risco de fraturas [4-9]. Ainda, a deficiência de estrógenos pode levar à disfunção das células β -pancreáticas, resistência à insulina, excesso de gordura no fígado, aterosclerose, aumento do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), intensificando assim alterações patológicas já oriundas da senilidade, como as doenças cardiovasculares, o risco de obesidade, ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica [1,10,11].

A síndrome metabólica engloba diferentes tipos de anormalidades associadas como a hipertensão, altos níveis de triacilgliceróis, baixos níveis de HDL, resistência à insulina, disfunções no metabolismo da glicose e estado pró-inflamatório [10,12], sendo a obesidade considerada uma das principais razões para o seu desenvolvimento [13,14]. Essa combinação de fatores compõe uma série de efeitos independentes sobre o metabolismo ósseo e que pode estar relacionada ao desenvolvimento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, uma vez que a privação de estrogênio também aumenta a probabilidade de desenvolvimento dessa disfunção a partir do aumento da gordura visceral, ganho de peso e resistência à insulina [15].

O padrão ouro para o tratamento da osteoporose é realizado a partir da administração de bifosfonatos, sendo o alendronato e o risedronato de sódio os antirreabsortivos orais de primeira escolha [16] em razão da meia vida longa e capacidade de permanência em seus respectivos sítios de ligação pelo período de meses a anos [17]. O risedronato é um composto piridilo da terceira geração [18] que contém nitrogênio em sua estrutura química, enquadrando-se como um bifosfonato nitrogenado, apresentando maior potência clínica e melhor afinidade de ligação ao tecido ósseo [19], ainda que a literatura sustente redução da formação de vasos sanguíneos em resposta ao ácido zoledrônico, demonstrando que além da atividade antirreabsortiva, os bifosfonatos nitrogenados possuem propriedades antiangiogênicas [20]. Dado que a osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos é

a complicação frequentemente associada ao uso dos bifosfonatos, classicamente considerada como uma necrose avascular por uma interrupção no fornecimento sanguíneo, a inibição da angiogênese é uma hipótese principal na fisiopatologia dessa complicação [21], além da supressão da remodelação óssea por inibição de osteoclastos acompanhada de esclerose óssea, isquemia, microtrauma constante e efeitos citotóxicos celulares [19,21].

Muitos mediadores químicos estão envolvidos no processo de reparo e cura de feridas a partir da inflamação, formação de tecido e remodelação. O mesmo transcorre durante o processo do reparo ósseo peri-implantar a partir do *turnover* ósseo, que também requer o envolvimento de mediadores solúveis, matriz extracelular e de células sanguíneas e parenquimatosas [22]. O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização produzida em resposta a diferentes estímulos, que atua como um mediador primário no aumento da massa óssea através da estimulação mecânica, inibindo a osteoclasia [23] e ainda, estudos *in vitro* apontam que o NO parece desempenhar um papel regulador autócrino e parácrino no metabolismo ósseo, a partir da modulação da atividade de osteoblastos, aumentando a proliferação osteoblástica e a síntese de osteocalcina, favorecendo a formação inicial da matriz mineral óssea [24,25].

O agente [Ru (terpy) (bdq) NO]³⁺ (TERPY) é um complexo de rutênio doador de óxido nítrico que aumenta a produção desse mediador pelas células endoteliais [26,27]. Estudos afirmam que o aporte sanguíneo é um fator crítico para a cura de fraturas e, considerando o papel do NO na angiogênese e na vasodilatação, esses dados fundamentam a influência desse mediador durante a cicatrização óssea através da inibição da apoptose de células endoteliais e por ação direta na produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [22]. Ademais, dados pré-clínicos contribuem quanto ao papel do NO na biologia óssea e sugerem que substâncias doadoras de NO podem prevenir a perda óssea em mulheres pós-menopáusicas [28], além dos estudos pilotos em humanos que apoiam o conceito do uso desses doadores para prevenir a perda óssea, assim como a administração de NO exógeno [24].

Em vista da grande demanda pela classe idosa em busca de tratamentos reabilitadores e estéticos a partir de implantes dentários, e de que essa mesma população compõe um cenário de saúde geral clinicamente comprometido [29-31], considerando o tratamento da osteoporose com o uso de bifosfonatos, associado ao estilo de vida a partir dos hábitos alimentares e suas interferências na condição sistêmica do indivíduo, estudos pré-clínicos que possam mimetizar essa situação devem caracterizar tanto os benefícios quanto os prejuízos

durante o reparo ósseo peri-implantar nesse modelo, uma vez que faz-se necessário o estudo da longevidade desses implantes para posteriores aplicações de cargas protéticas [21, 32].

O modelo animal OVX (rata submetida à ovariectomia) já é consolidado na literatura como um indutor da osteopenia e osteoporose por meio da deficiência de estrógeno que se estabelece após a remoção dos ovários [33]. Em adição, a instalação de implantes em maxila de ratos *Wistar* demonstra ser um modelo experimental interessante para o estudo da osseointegração em ratas ovariectomizadas, proporcionando resultados e aspectos mais próximos dos eventos que ocorrem durante o processo de reparo em humanos [34-36].

Modelos de dietas hipercalóricas manipuladas visam mimetizar os padrões de má nutrição humana para caracterização das consequências e propostas reversivas decorrentes dessa situação. A dieta de cafeteria é um modelo experimental proposto para estudar a obesidade e síndrome metabólica que consiste em associar a ração comercial do animal às comidas humanas altamente palatáveis, calóricas e não saudáveis, simulando parte dos hábitos alimentares das pessoas dos países ocidentais [37,38]. Em ratos, a dieta de cafeteria promove o aumento de peso, hiperfagia, quadro pré-diabético, resistência periférica à insulina, aumento dos níveis de leptina, colesterol total e triacilgliceróis séricos, além de inflamação dos tecidos adiposo e hepático [1,37,39-42].

Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi de avaliar e caracterizar o processo de reparo ósseo peri-implantar em maxilas de ratas ovariectomizadas que apresentavam síndrome metabólica induzida por dieta de cafeteria, tratadas com risedronato de sódio e instalação de implantes funcionalizados com um agente doador de óxido nítrico (TERPY) em sua superfície.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

FASE 1

2.1 Experimentos preliminares

2.2 Caracterização biológica e físico-química dos discos de titânio

Nessa fase, foi realizada a funcionalização das superfícies dos discos de titânio com o agente $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY). Na sequência, foram executados os testes biológicos e físico-químicos, com o objetivo de caracterizar a superfície desenvolvida quanto à melhor concentração de TERPY, morfologia, composição, para validação da superfície e utilização nos experimentos *in vivo*.

2.2.1 Preparo dos discos e concentrações

Os experimentos de culturas de células foram realizados sobre as superfícies de discos de titânio (Emfils®, Itu, SP, Brasil) submetidos ao jateamento e duplo ataque ácido e funcionalizados com o agente doador de óxido nítrico – TERPY. As nomenclaturas dos discos e as diferentes concentrações de TERPY testadas estão descritas a seguir.

- **CONV**: disco de titânio sem tratamento com o agente (controle).
- **TPY (-)**: disco que recebeu Layer-by-Layer com Terpy 10 μ M.
- **TPY (+)**: disco que recebeu Layer-by-Layer com Terpy 100 μ M.

Para a realização dos testes foram utilizados 6 discos por superfície avaliada, com ensaios em triplicata (18 discos por superfície testada). A técnica Layer-by-Layer e o preparo

dos discos foram realizadas em Laboratório para Estudos de Tecidos Mineralizados (LSMT) – FOA/UNESP (Araçatuba – SP), sob a orientação do Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho, da FC – UNESP (Bauru – SP). A camada aplicada na superfície dos implantes foi composta por poliestireno sulfonado (PSS) e óxido de titânio (TiO₂), sendo finalizada por cada uma das concentrações de TERPY.

2.3 Experimentos *in vitro* para validação de concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO]³⁺ (TERPY)

As superfícies dos discos funcionalizados pelo agente [Ru (terpy) (bdq) NO]³⁺ (TERPY) foram avaliadas biologicamente, a partir de experimentos em culturas de células que foram desenvolvidos no laboratório da Prof^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP (São José dos Campos – SP). As células foram avaliadas sobre a superfície de discos de titânio submetidas ao jateamento e duplo ataque ácido, tanto para os discos CONV, quanto para TPY (-) e TPY (+).

2.3.1 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, os experimentos de cultura de células foram executados. Os animais, ratas *Wistar*, foram submetidos à eutanásia para a coleta das amostras doadoras. Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, com modificação de alfa com L-glutamina (α -MEM – Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque). No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura osteogênico [43]. Posteriormente, essas células foram distribuídas em frascos para cultura (Nunc, Dinamarca) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente [44]. Foram plaqueadas 2x10⁴ células

viáveis em cada poço da microplaca de 24 poços (Nunc, Dinamarca), sendo acrescentado meio de cultura osteogênico para obtenção do volume final de 1 ml. Essas placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e os osteoblastos de todos os grupos foram avaliados quanto a viabilidade celular, o conteúdo de proteína total, a atividade de fosfatase alcalina, a formação de nódulos de mineralização e o citoesqueleto celular. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicata [45], sendo que cada triplicata foi um *pool* de células provenientes do fêmures n(8) de 4 animais de cada grupo.

2.3.2 Determinação da viabilidade celular

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma Aldrich) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Como controle positivo, foi utilizada a solução de fenol a 0,2% e o controle negativo foi o fundo da placa. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após os períodos de 3, 7 e 14 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570nm (Biotek EL808IU) [45]. Os dados foram aferidos como absorbância.

A partir dos valores médios de absorbância obtidos, para cada uma das superfícies, tanto CONV, quanto para TPY (-) e TPY (+), foi realizado o cálculo para determinação da viabilidade celular [46]. Os valores superiores a 70% foram considerados satisfatórios (ISO 9001/2000).

2.3.3 Análise de formação de nódulos de mineralização

As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂, por 14 dias. Após esse período, foi quantificada a formação de nódulos de mineralização, utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma Chemical Chemical, USA), que foi mensurada no espectrofotômetro a 405nm [45]. Os valores foram obtidos em absorbância.

2.3.4 Genotoxicidade

Para avaliar o dano nuclear presente nas células mesenquimais nos períodos de 5 e 10 dias, foi utilizado o teste de micronúcleos realizado de acordo com o guideline de OECD, atualizado em 2014 (TG487). As células mesenquimais obtidas dos fêmures foram cultivadas em meio essencial mínimo, com modificação de alfa com L-glutamina (α -MEM – Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) a 37°C e com 5% de CO₂. Para o teste, 3x10⁵ células foram cultivadas em lâminas de vidro em 4 ml de meio celular por 24 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram incubadas com citocalasina B (Sigma-Aldrich) na concentração de 6 µg/ml por 24 horas, a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, para inibir a citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. As células foram submetidas ao choque hipotônico e fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 10 minutos; esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Após secagem, as células foram coradas em GiemsaWright a 5% por 6 minutos. Os micronúcleos foram analisados em microscópio de imersão (100X), sendo que foram avaliadas 2.000 células/placa por concentração em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma, claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Foram contadas as células com menos de cinco micronúcleos.

2.4 Funcionalização dos implantes após a validação da TERPY

Após as validações das diferentes concentrações de TERPY e a seleção da que possui maior viabilidade celular, as superfícies dos implantes foram funcionalizadas.

Os resultados desta etapa, bem como qual a concentração de TERPY eleita está descrita no item 3.2 dos Resultados.

2.4.1 Funcionalização das superfícies dos implantes

Após a concentração ideal de TERPY ser eleita, a superfície dos implantes foi funcionalizada pela preparação de filmes Layer-by-Layer (LbL).

Foi imerso um substrato sólido (com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície) por determinado intervalo de tempo, numa solução aquosa contendo o material a ser depositado. A carga desse material foi contrária à do substrato para que ocorresse adsorção

por atração eletrostática. Posteriormente, o conjunto substrato + monocamada foi lavado a fim de eliminar o excesso de material. Em seguida, o conjunto foi seco com ar comprimido e imerso numa solução contendo outro material, de carga contrária à do material inicialmente depositado, formando assim filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas. O novo conjunto substrato + bicamada foi lavado e seco novamente. Foi empregado o eletrólito poliestireno sulfonado (PSS), de carga negativa, no qual o fármaco estava disperso, e uma solução de eletrolítica de TiO_2 , carga positiva, previamente preparada pelo método sol-gel [47].

O crescimento de filmes pela técnica LbL é de domínio no Laboratório de Materiais Avançados da UNESP de Bauru, coordenado pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho. [47-50].

2.4.2 Caracterização das superfícies por MEV-EDS

A caracterização microestrutural da superfície tratada foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão eletrostática (FEMEV, Zeiss-SUPRA35) operado a 5 kV, em diferentes magnificações. Para a realização das imagens no modo varredura, a superfície foi previamente preparada com a adição de uma pequena quantidade da amostra em um béquer contendo acetona que foi submetido ao tratamento ultrassom por 15 minutos. Em seguida, 2 gotas da solução foram depositadas sobre um substrato de silício, o qual foi devidamente colado com uma fita adesiva de carbono sobre o porta-amostra (stub). Após a secagem da solução no substrato, foi realizado o contato elétrico através da aplicação de tinta prata condutora em uma das extremidades do substrato. As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de alta resolução (HRMET) foram realizadas em um microscópio JEOL (JEM, 2100 HT) operado a 200 kV [51].

2.5 Procedimentos experimentais para determinação da quantificação de TERPY

Com o objetivo estudar a determinação quantitativa do fármaco TERPY presente na superfície, foi utilizada uma abordagem analítica, método disponível na Faculdade de Ciências de Bauru.

2.5.1 Análise da quantificação de TERPY por espectroscopia na região do UV-Vis

O crescimento de LbL foi monitorado por medições de absorbância de UV-vis realizado na faixa de 200-600 nm usando um PerkinElmer Lambda.

Espectrofotômetro 1050 com vidro de sílica fundida como substrato previamente tratado com solução de “piranha” (mistura de H₂O₂ e H₂SO₄ - 1: 3, v / v) por 2 h.

A análise estrutural foi investigada por espectroscopia FTIR realizado em um Bruker Vertex 70 em uma faixa de 4000 a 400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹. Os filmes de LbL foram depositados em sulfato de cério com as medições registradas contra um espectro de fundo do substrato. A morfologia do filme LbL foi analisado sobre vidro de sílica fundido por AFM em um Park System XE7.

Foi empregado sulfato de cério como agente oxidativo, dessa forma a absorção a 320nm é proporcional a quantidade de droga oxidada. Anteriormente as medidas, uma solução aquosa 0,5 M de ácido sulfúrico foi preparada e utilizada como solvente para dissolução do cério. Em seguida preparou-se uma solução 0,1% m/v de sulfato de cério em H₂SO₄. O fármaco TERPY foi dissolvido em 1 mM de KCl. A curva de calibração foi preparada adicionando uma alíquota de 250 µL da solução de fármaco em 750 µL da solução de sulfato de cério e a mistura permaneceu em repouso durante 1 hora. Após esse período, adicionou-se 5 ml de 0.5 M de H₂SO₄. Como o branco do experimento (controle), utilizou-se 250 µL de 1 mM KCl diluído da mesma maneira que o fármaco. Em todas as medidas 1 ml da mistura foi adicionado a cubeta. A curva de calibração foi determinada através de soluções do fármaco com concentrações entre 0-2 mM, com um passo de 0,1 mM, com base nos pontos experimentais da reta característica, de acordo com a equação abaixo.

$$Abs (conc) = 0.54225 (\pm 0.00778) .conc$$

Já os experimentos de funcionalização dos implantes foram realizados adicionando-se 3 mL de solução do fármaco numa concentração de 2 mM; estes foram funcionalizados individualmente e preparados em triplicata. Após 2 horas, os implantes foram removidos e uma alíquota de 250 µL de solução foi colocada para reagir com sulfato de cério.

FASE 2

2.6 Experimentos *in vivo*

Após as validações das diferentes concentrações de TERPY, a seleção da que possui maior viabilidade celular e após a funcionalização das superfícies dos implantes, foram realizados os experimentos *in vivo*, com o objetivo de avaliar a ação sinérgica entre fármacos administrados local e sistemicamente (bifosfonatos), e caracterizar de maneira geral, as respostas iniciais do tecido ósseo peri-implantar quanto aos eventos formação, reabsorção e mineralização óssea.

2.7 Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (Nº 00563/2018) (Anexo A), quarenta e oito ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso médio de 350 gramas, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, foram alocados aleatoriamente. As ratas foram divididas em 6 grupos (n=8) que foram distribuídas de acordo com a condição sistêmica (ovariectomizadas e síndrome metabólica), tratamento ou não com risedronato e instalação de implantes de superfície convencional (CONV) ou superfície funcionalizada (TERPY), como discriminado a seguir:

- **SHAM CONV**: ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV).
- **OVX SM CONV**: ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV).

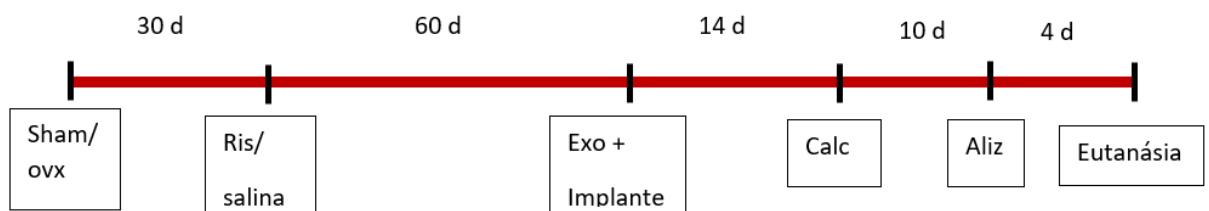
- **OVX SM RIS CONV**: ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície convencional (CONV).
- **SHAM TERPY**: ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY).
- **OVX SM TERPY**: ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY).
- **OVX SM RIS TERPY**: ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY).

Os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1,4% Ca²⁺ e 0,8% P e água *ad libitum*.

2.8 Delineamento experimental

Nesse estudo, o período de avaliação do reparo ósseo peri-implantar foi de 28 dias, com realização da instalação de implantes imediatos. A figura 1 resume as etapas realizadas nos experimentos *in vivo*.

FIGURA 1 – Delineamento experimental - Experimentos *in vivo*



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Para mimetizar a deficiência de estrogênio e a síndrome metabólica, os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e alimentadas com dieta de cafeteria; nos grupos correspondentes ao tratamento, foi administrado sistemicamente o risedronato como medicação anti-osteoporose. O fármaco administrado localmente por meio da funcionalização da superfície dos implantes foi a TERPY, que foi incorporado à superfície dos implantes a serem instalados nas maxilas das ratas. A incorporação do fármaco à superfície dos implantes ocorreu como descrito na Fase 1 desse projeto. As análises propostas foram divididas em: Maxilas Direitas (Biomecânica por torque reverso e PCR em tempo real) e Maxilas Esquerdas (Microtomografia Computadorizada e Microscopia Confocal a Laser).

No tempo zero ($t=0$), as ratas selecionadas para o experimento foram submetidas à cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia bilateral. Após a recuperação da cirurgia, os animais receberam a dieta de cafeteria para mimetizar síndrome metabólica. Passados 30 dias ($t=30$), o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio (0,7mg/kg/semana) ou solução salina no volume de 0,3ml, via gavagem, foi iniciado. Aos 60 dias após o início do tratamento medicamentoso ($t=90$), a cirurgia de exodontia do primeiro molar superior foi realizada e a instalação imediata dos implantes de forma bilateral. Quatorze dias após a cirurgia de instalação dos implantes ($t=104$), todos os grupos experimentais receberam a injeção intramuscular do fluorocromo calceína (20 mg/kg) e 10 dias após a aplicação de calceína ($t=114$), os mesmos animais receberam injeção intramuscular do fluorocromo vermelho de alizarina (25 mg/kg). As injeções dos fluorocromos objetivaram avaliar a dinâmica óssea dos tecidos calcificados.

Aos 28 dias pós-operatórios (dia da eutanásia, $t=118$), os animais foram anestesiados e nas maxilas do lado direito, os implantes foram removidos utilizando um torquímetro digital, para obtenção dos dados quanto ao torque de remoção. Imediatamente após a remoção dos implantes, o tecido ósseo em contato com as espiras dos implantes foi removido para posterior realização análise de PCR tempo real, com o intuito de avaliar a expressão relativa de genes envolvidos ao metabolismo do tecido ósseo. As maxilas do lado esquerdo foram reservadas para o escaneamento por microtomografia computadorizada e, após o armazenamento das imagens reconstruídas e o processamento pelos softwares para avaliação morfométrica do tecido ósseo reparacional, estas mesmas peças passaram pelo processamento para histologia de tecidos calcificados (análise dos fluorocromos).

2.8.1 Castração bilateral - Ovariectomia

A remoção cirúrgica dos dois ovários foi realizada logo após as ratas serem anestesiadas com uma combinação de cetamina (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) associada ao cloridrato de xilazina (dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha), administrada por via intramuscular, e na sequência, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Foi realizada uma incisão de 1cm no flanco, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Após a localização dos ovários e os cornos uterinos, estes foram laqueados com fio de poliglactina 910 4.0 (Vicryl tm– Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) e a remoção dos ovários foi realizada. Finalizada a cirurgia, foi feita a sutura por planos com fio de poliglactina 910 4.0 (Vicryl tm–Jhonson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). A ovariectomia foi realizada nos grupos OVX SM e OVX SM RIS, tanto para as superfícies convencionais (CONV), quanto para a superfície funcionalizada (TERPY).

As ratas do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas com a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários, sem suas respectivas laqueaduras e remoção para mimetização do estresse cirúrgico da ovariectomia.

2.8.2 Ciclo estral

Para garantir a ciclagem normal dos animais utilizados, as ratas ovariectomizadas (OVX SM e OVX SM RIS tanto CONV, quanto TERPY) foram mantidas em gaiolas individuais e, diariamente, foram introduzidas no interior da vagina de cada animal 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata [52], reconhecimento das fases do ciclo estral. As ratas foram selecionadas para continuidade das etapas laboratoriais após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares.

Essa técnica foi utilizada com o intuito de validar a cirurgia de ovariectomia bilateral realizada, ou seja, para constatar a ausência do ciclo, confirmando a efetividade da remoção cirúrgica dos ovários.

2.8.3 Tratamento medicamentoso

Após 30 dias da cirurgia de ovariectomia e após a verificação do ciclo estral das ratas, os animais referentes ao grupo OVX SM RIS (CONV e TERPY) foram submetidos à terapia medicamentosa com risedronato de sódio por 60 dias. O medicamento foi administrado por gavagem, um volume de 0,3ml na dose de 0,7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana; a dose foi determinada com base na dose semanal (35mg) dividida por 50 kg que representa o peso do corpo humano [53].

No mesmo período, para os animais dos grupos que não representaram o tratamento com o risedronato (SHAM e OVS SM tanto CONV, quanto TERPY), foi administrada, via gavagem, um volume de 0,3ml de solução salina 0,9%, uma vez por semana.

As gavagens foram iniciadas após 30 dias da cirurgia de ovariectomia, tanto para os grupos ovariectomizados, quanto para os grupos correspondentes à cirurgia fictícia, e foram realizadas até o momento da eutanásia.

2.8.4 Dieta de cafeteria para indução da Síndrome Metabólica

Para a dieta de cafeteria, foram utilizados alimentos industrializados, com o intuito de fornecer uma dieta de alta densidade energética, de caráter hiperlipídico e hipoproteico de alto índice glicêmico [54,55].

Para cada animal, foi pesada diariamente a quantidade de 30g da alimentação, que variou entre bolachas recheadas, bolachas tipo “*waffer*”, salgadinho de milho associada a uma garrafa de água com 12% de sacarose (Tabela 1).

TABELA 1 – Quantidade de alimento dada para os animais por dia

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

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Foram realizados em todos os animais dos grupos que representam a síndrome metabólica (SM) o controle do peso, aferição de glicemia e avaliação da massa corporal pelo índice de Lee de maneira a validar o desenvolvimento das alterações metabólicas propostas. Os períodos avaliados foram: T1 - medida realizada antes da cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia, T2 - medida realizada antes da exodontia/instalação dos implantes, T3 - medida realizada antes da eutanásia. (Referência)lee

A dieta de cafeteria foi iniciada no mesmo dia do procedimento cirúrgico de ovariectomia e mantida até a eutanásia.

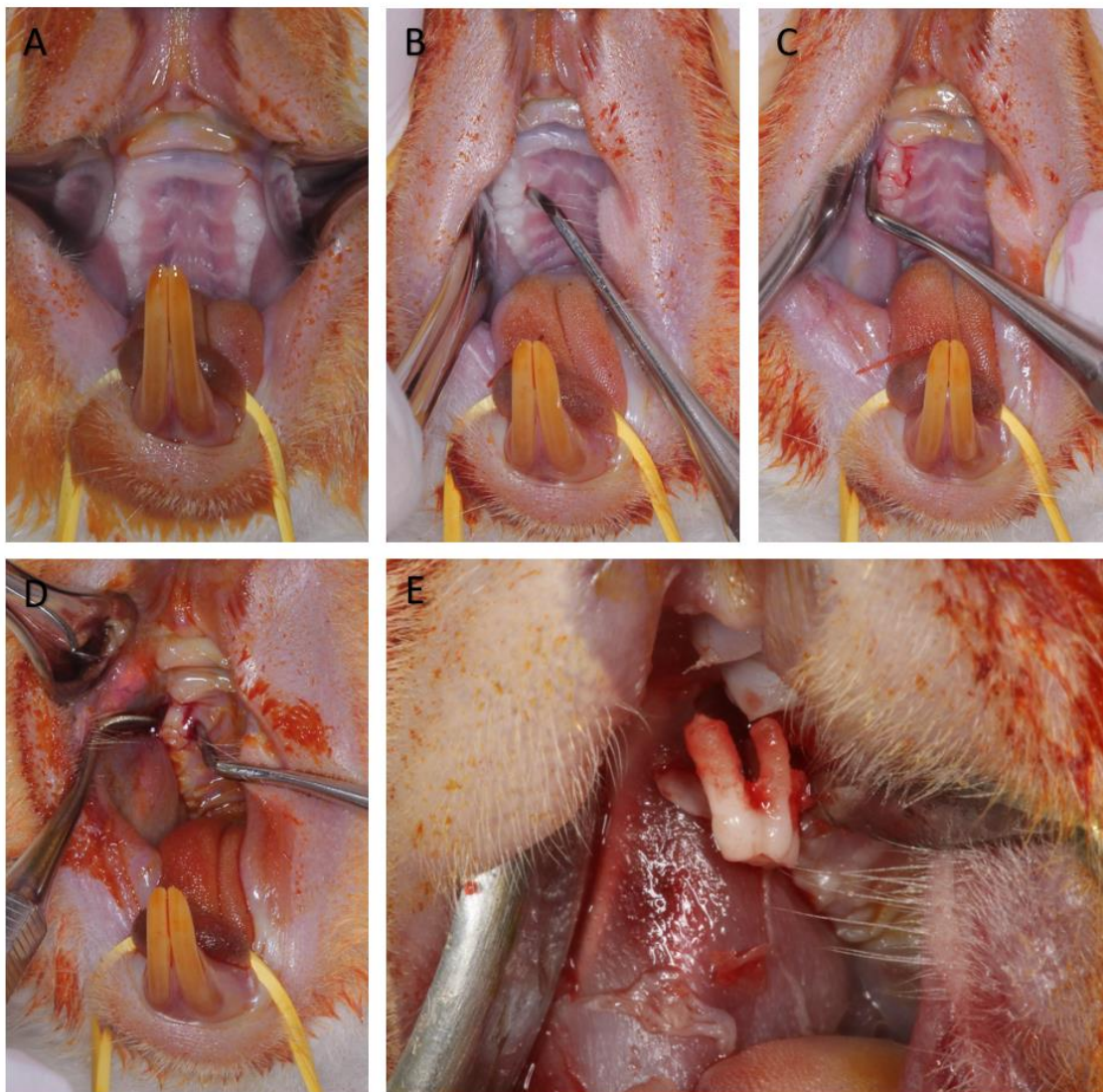
2.8.5 Cirurgia de exodontia

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

Após a sedação, cada animal foi posicionado na mesa cirúrgica confeccionada especialmente para procedimentos cirúrgicos em roedores, viabilizando a abordagem à

maxila, favorecendo a manutenção da cavidade bucal aberta e proporcionando uma posição adequada para o procedimento de exodontia e posteriormente instalação dos implantes.

A antissepsia da região foi realizada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). Após antissepsia, o processo de exodontia do primeiro molar superior foi iniciado, com o auxílio de um esculpador Hollembach nº 3S (Quinelato, Rio Claro – SP), primeiramente pela manobra de diérese, por meio da sindesmotomia, seguida da expansão alveolar (luxação) do primeiro molar superior, com o mesmo instrumental, por ações de cunha e alavanca, permitindo a elevação do elemento dentário do alvéolo, realizando-se de fato a exodontia (Figura 2).

FIGURA 2 – Cirurgia de Exodontia

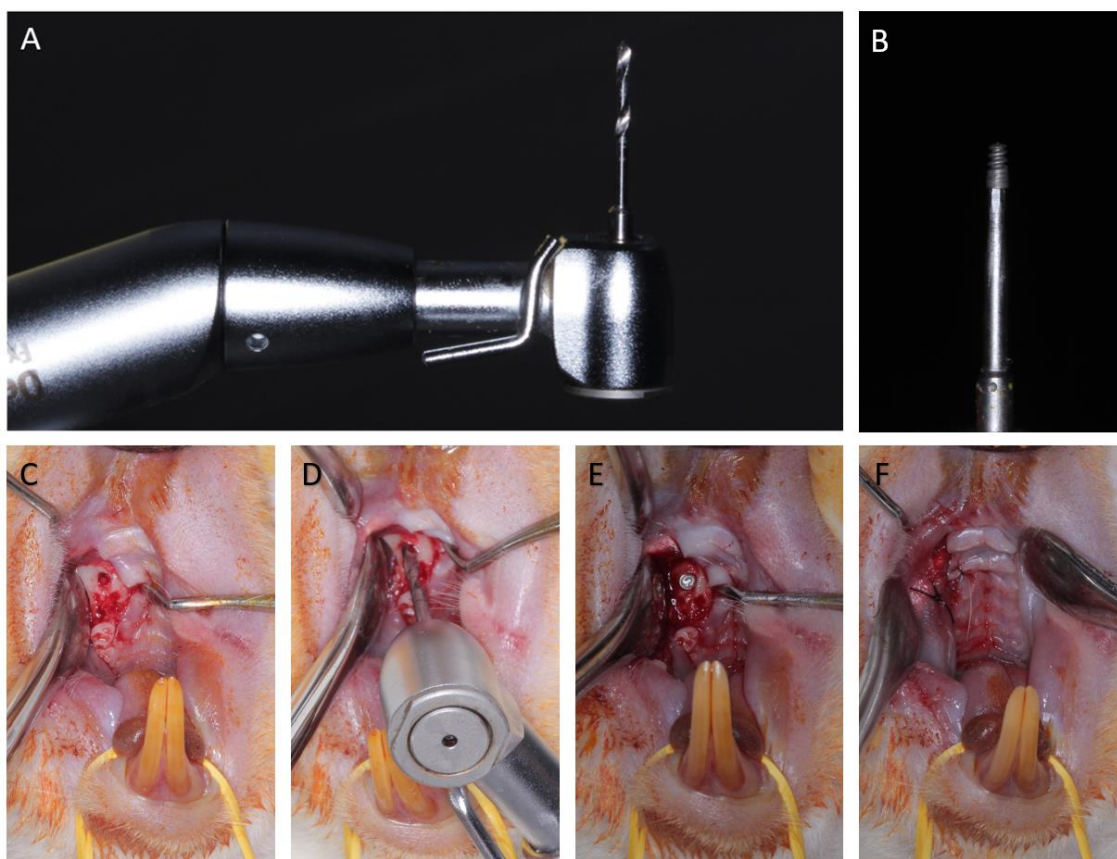
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021). Em **A.** Exposição da maxila; **B.** Início da sindesmotomia; **C.** Sindesmotomia completa; **D.** Expansão alveolar (luxação) e **E.** Exodontia.

2.8.6 Cirurgia para instalação dos implantes imediatos

Após a exodontia do elemento dentário, foi realizada uma extensão do acesso para anterior, e uma incisão intrasulcular até o segundo molar superior, produzindo-se um retalho em envelope. O descolamento e afastamento dos tecidos foi realizado com o auxílio de um descolador de Molt, pela face vestibular e Hollemback 3s, por palatino.

O alvéolo da raiz mesial do primeiro molar foi determinado como o local mais adequado para a instalação do implante. A fresagem do alvéolo se iniciou com a broca direcionada discretamente para o lado vestibular [56] (Figura 3).

FIGURA 3 – Cirurgia para instalação dos implantes imediatos



Fonte: Elaborado pelo Atutor (2021). Em **A.** Broca helicoidal 1,1 mm acoplada ao contra-ângulo; **B.** Implante personalizado (Medens, São Paulo, SP); **C.** Exposição do leito cirúrgico, após a exodontia; **D.** Fresagem – preparo do leito cirúrgico; **E.** Instalação do implante no alvéolo da raiz mesial; e **F.** Sutura.

Foram instalados 96 implantes de titânio comercialmente puro grau IV, baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils, São Paulo, Brasil), com diâmetro de 1,4 mm e altura de 2,7 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com broca helicoidal de 1,1 mm de diâmetro acoplada ao contra-ângulo com redução de 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany), montada no 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 profundidade de 3,0 milímetros. O travamento e estabilidade primária foram comprovados.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo uma abordagem bilateral na região de primeiro molar superior, instalados com o auxílio de uma chave digital. Para o fechamento dos tecidos (síntese), foi utilizado o fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil), com sutura em pontos interrompidos.

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

2.8.7 Aplicação dos fluorocromos

Quatorze dias após a cirurgia de instalação dos implantes, via intramuscular, o fluorocromo calceína foi administrado a cada animal (20 mg/kg). Após 24 dias da cirurgia de instalação dos implantes, o fluorocromo vermelho de alizarina (25 mg/kg) foi injetado nos mesmos animais. [57-59]. Ambos os fluorocromos indicam, respectivamente, a deposição de osso antigo e a de osso neoformado.

2.8.8 Eutanásia

Os animais foram sacrificados por sobredose de anestésica (150 mg / kg, Tiopental Cristália Ltda.; Itapira, SP, Brasil) 28 dias após a instalação dos implantes [57].

2.9 Análises – Maxila dividida – Lado direito

2.9.1 Análise Biomecânica – Torque reverso

Os animais foram anestesiados por uma combinação de 50 mg/kg de cetamina por via intramuscular e 5 mg/kg de xilazina e foram submetidos a uma cirurgia de reabertura para a exposição do módulo da crista dos implantes e realização do torque reverso.

Para essa análise, foi utilizado um torquímetro digital (Homis, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma chave digital hexagonal de 0,9 mm (Medens, São Paulo, SP, Brasil), a mesma chave digital utilizada para instalação dos implantes. Após a estabilização da maxila e exposição do módulo da crista do implante, o conjunto torquímetro-chave digital foi posicionado e adaptado ao implante, aplicando-se um movimento no sentido anti-horário, gerando um torque reverso, até que houvesse a liberação da interface osso-implante. O torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística ($p < 0,05$).

2.9.2 Análise de PCR em tempo real

O tecido ósseo remanescente após a realização da remoção do implante pela análise biomecânica por torque reverso foi coletado e imediatamente lavado em PBS (solução tampão fosfato); para esse processamento, os animais ainda estavam anestesiados e o período de coleta antecedeu a eutanásia.

Após a coleta, o tecido ósseo peri-implantar foi armazenado em nitrogênio líquido. O RNA foi extraído com o reagente Trizol (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após analisada a pureza e concentração de RNA por espectrofotometria e, integridade através de gel de eletroforese, o cDNA foi obtido usando 1µg de RNA por transcriptase reversa com o kit Life (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [60-62].

O PCR em tempo real foi realizado pelo sistema de detecção Step One Plus (Life Biotechnologies), utilizando outro sistema, o SybrGreen (Applied Biosystems, Warrington,

UK), sob diferentes condições de temperatura, seguido por desnaturação da curva padrão obtida com a mistura principal pelo kit Takman (Life Biotechnologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Através da B-actina e B2M (Life Biotechnologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), foi localizada a região onde as amostras iniciaram sua ampliação e, na sequência, foram realizados ensaios *taqman* inventariados para detecção da expressão dos genes para ALP (Fosfatase alcalina), iBSP (Sialoproteína óssea), OCN (Osteocalcina), OPG (Osteoprotegerina), RANKL (Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante), TRAP (Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico) e VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial). Portanto, a expressão gênica foi calculada em relação à expressão de proteínas ribossômicas e normalizada pela expressão gênica dos ossos fragmentados coletados aos 28 dias de reparação óssea, pelo método $\Delta\Delta CT$. Os ensaios foram executados em quadruplicada e os dados comparados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.10 Análises – Maxila dividida – Lado esquerdo

2.10.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Após obtenção e redução das peças, fixação em solução de formaldeído 10% por 48 horas e lavagem em água corrente por 48 horas, as peças foram armazenadas em álcool 70% até o momento da análise.

As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de cobre e alumínio, e passo de rotação de 0.4 mm, resolução de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 56 minutos. 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 2, correção dos anéis de artefato de 5 e correção de BeamHardening de 45%.

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em 3 planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), as imagens foram analisadas, e definidos os valores para o contato osso-implante (BIC). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (*thershold*); o *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, até a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes.

Para caracterização da microarquitetura óssea foram avaliados os parâmetros de porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação de trabéculas (Tb.S) e superfície de intersecção (i.S), para então a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7) [63].

Os dados coletados foram analisados e submetidos à análise estatística com nível de significância para $p < 0,05$.

2.10.2 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)

Após a realização da análise microtomográfica, as peças foram processadas para avaliação histométrica da dinâmica óssea peri-implantar a partir das injeções dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina previamente realizadas.

As peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois. Ao término da desidratação, as peças foram imersas numa mistura de álcool 100% e metilmetacrilato termopolimerizável (JET), em diferentes concentrações. Ao final da desidratação das peças calcificadas, estas foram incluídas em resina termopolimerizável (Technovit 7200 VLC) e acrilizadas. Após a polimerização da resina, as peças foram inicialmente desgastadas por broca maxicut. Posteriormente, essas foram submetidas ao desgaste manual, em lixas de diferentes granulações na Politriz (Arotec), até a obtenção de cortes a uma espessura de 100µm. Esses mesmos cortes foram confinados em lâminas histológicas a partir de lamínulas.

A partir da obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópico confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens obtidas a partir de diferentes secções das maxilas na região ao redor dos implantes, foram comprimidas a fim de obter o melhor ajuste. Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do “zstack”, que permitiu obter o melhor ajuste de imagens representadas pela secção da maxila de cada animal. A captura das imagens foi realizada a partir do início da fluorescência que representou, nesta metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica); as imagens apresentaram dimensões de 1x1 mm² e corresponderam a secções óticas de 512x512 pixels e secções de 2µm foram escaneadas por 2,5 minutos. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530nm/30nm e LP 590nm, combinados com a ativação do “double dichroic” 488/568nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina, que permitiram a visualização dos fluorocromos; um dos filtros possibilitou a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, da alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal a laser foram reconstituídas através da pilha de software que foi instalado para manipular o microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

O osso alveolar peri-implantar apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representou a precipitação de cálcio em cada um dos

períodos de 14 e 24 dias da aplicação dos fluorocromos, exibindo assim a conversão de osso antigo para osso novo.

As imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada). Nesse programa, através da ferramenta “*color threshold*”, cada imagem foi padronizada de acordo com a matiz, saturação, e brilho para evidenciação dos fluorocromos analisados. Primeiramente, a cor verde foi evidenciada (calceína) e pela ferramenta “*measure*” o programa forneceu a área correspondente em μm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para a cor vermelha (alizarina), obtendo-se dados referentes à dinâmica do tecido ósseo peri-implantar alveolar. O *turnover* ósseo foi representado pela diferença entre osso antigo (verde) e osso novo (vermelho).

Para obtenção da taxa de aposição mineral diária (MAR – Mineral Apposition Rate) da área de fluorocromos, as imagens foram novamente transportadas ao software ImageJ (Processamento de Software e Análise de Imagem, Ontário, Canadá) para a padronização individual. A ferramenta “*straight*” foi selecionada e foram traçadas 4 linhas entre o início da precipitação de alizarina (marcação vermelha) até o final da precipitação de calceína (marcação verde); os valores foram divididos por 10, número que remete o período de dias entre as injeções de calceína e alizarina, representando a precipitação diária de cálcio. Em seguida foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) na imagem representativa da sobreposição dos fluorocromos [58].

Os dados coletados foram analisados e submetidos à análise estatística com nível de significância para $p < 0,05$.

2.11 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism 7.03 (Software GraphPad; La Jolla; EUA). Para todas as análises quantitativas obtidas foram aplicados os testes de normalidade e homoscedasticidade (Shapiro-Wilk), a fim da verificação de distribuição dos dados. Para a análise estatística dos dados de nódulos de mineralização da Fase 1, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Na sequência, para as análises restantes, foi aplicado o teste Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações às análises de genotoxicidade e MAR, e dos pós-testes de Sidak e Dunnett, também para múltiplas comparações, para a biomecânica e análise de PCR em tempo real, respectivamente ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

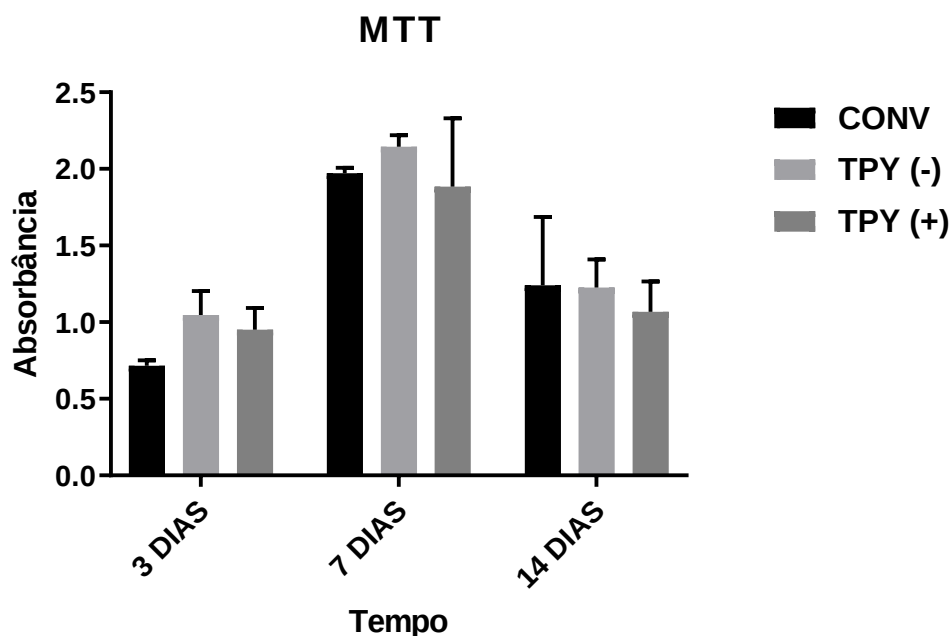
3.1 Validação da concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO]³⁺ (TERPY)

3.1.1 Viabilidade celular

Os dados referentes à absorbância a partir do MTT, que avaliou o metabolismo celular nas diferentes concentrações de TERPY (TPY (-) = 10 μ M e TPY (+) = 100 μ M), não apresentaram interações entre os fatores tratamento x tempo ($p=0,5945$). Foi observada uma interação somente ao fator “tempo” ($p=0,0001$), sem diferença estatisticamente significativa.

Aos 7 dias, houve maior absorbância para todas as superfícies analisadas em relação aos demais períodos (Gráfico 1).

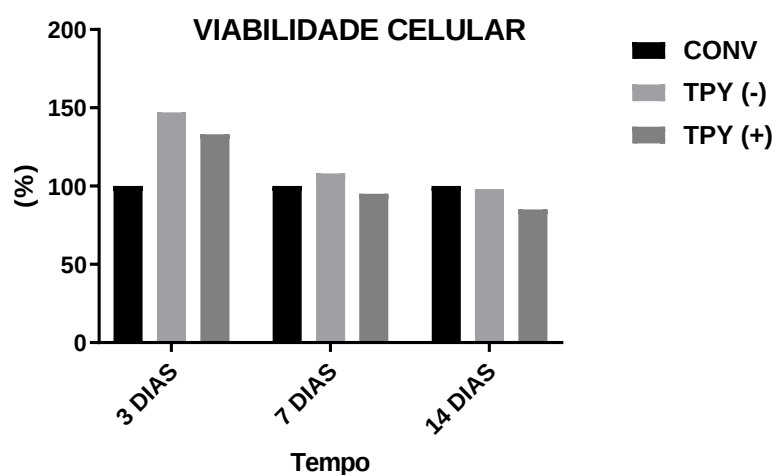
GRÁFICO 1 – Absorbância por MTT



Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). MTT (absorbância x tempo). Não houve diferença estatisticamente entre as superfícies e períodos analisados.

Como descrito na metodologia, o cálculo para a determinação da viabilidade celular considerou valores superiores a 70% como satisfatórios em todas as superfícies. (Gráfico 2). Foi observada uma melhor viabilidade celular para TPY (-) aos 3 e 7 dias e ainda, que aos 14 dias, essa superfície mostrou-se semelhante à CONV.

GRÁFICO 2 – Viabilidade celular

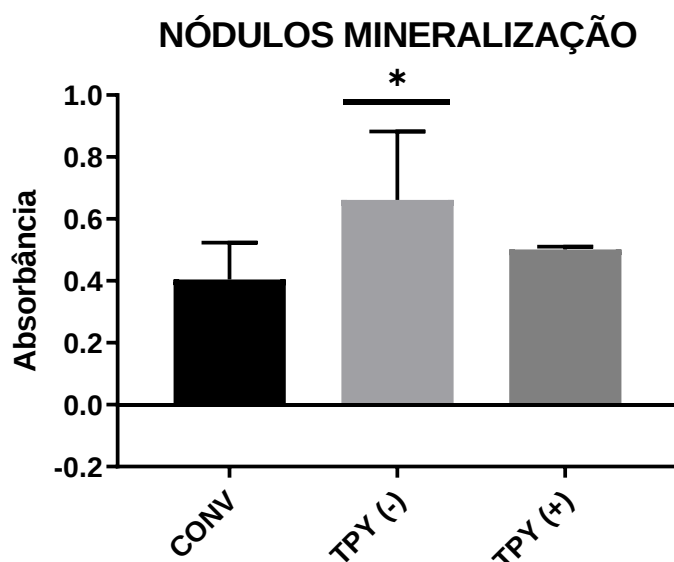


Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Valores representativos para viabilidade celular para as superfícies nos diferentes períodos, de acordo com a ISO 9001/2000.

3.1.2 Nódulos de Mineralização

Para a formação dos nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento das células, a superfície TPY (-) (10 μ M) apresentou maiores valores que a superfície CONV ($p=0,0024$), bem como para TPY (+) (100 μ M) ($p<0,05$), revelando que a menor concentração de TERPY possa promover um melhor início na atividade de precipitação óssea (Gráfico 3).

GRÁFICO 3 – Nódulos de mineralização

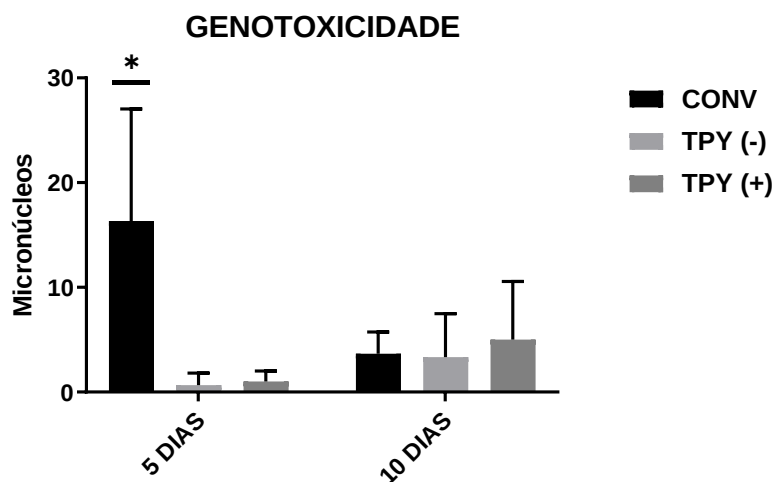


Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Maiores valores médios para TPY (-), com diferença estatisticamente significativa entre TPY (-) e CONV – Kruskal-Wallis ANOVA e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

3.1.3 Teste de micronúcleos

Para a contagem de micronúcleos após 5 e 10 dias dos plaqueamentos celulares, houve interação entre os fatores tratamento x tempo ($p=0,0337$). A diferença estatística foi observada após os 5 dias para superfície TPY (-) quando comparada a CONV ($p=0,0092$) e TPY (+) ($p=0,0106$), exibindo a menor genotoxicidade celular para superfície funcionalizada de menor concentração. Ainda, verifica-se que há um desempenho semelhante de todas as superfícies aos 10 dias após o plaqueamento (Gráfico 4).

GRÁFICO 4 – Genotoxicidade celular



Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Menores valores médios para TPY (-), com diferença estatisticamente significativa para TPY (-) comparada a CONV e TPY (+) – Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2 Seleção da melhor concentração de TERPY

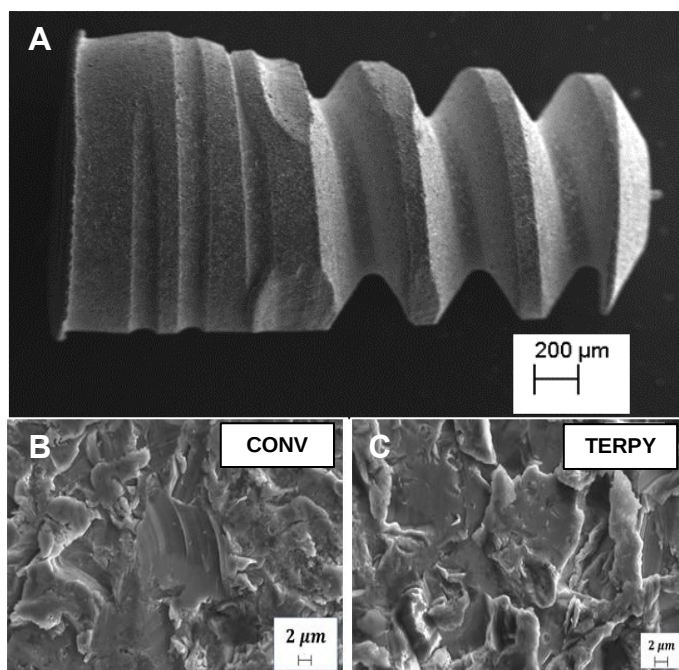
Após os valores obtidos a partir da análise *in vitro*, a viabilidade celular apresentou poucas diferenças entre as duas concentrações de TERPY avaliadas (10 μ M e 100 μ M), com valores semelhantes à superfície convencional (CONV) aos 14 dias. Porém, baseando-se nos dados estatísticos obtidos a partir das análises de nódulos de mineralização e genotoxicidade, a superfície TPY (-) (10 μ M) apresentou melhor indução no início da precipitação mineral óssea aos 14 dias e menor toxicidade celular quando comparada às outras superfícies após 5 e 10 dias de plaqueamento, sendo a esta a superfície de eleição do trabalho.

Após a funcionalização dos implantes com a superfície TPY (-), estes foram empregados para a continuidade das análises *in vivo* (Fase 2) desse estudo.

3.3 Dados físico-químicos após seleção da TPY (-)

3.3.1 Caracterização das superfícies

A figura 4 representa as imagens obtidas através da MEV do implante utilizado, bem como as imagens em maior aumento para as superfícies CONV e TPY (-).

FIGURA 4 – MEV-EDS

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021). Em **A.** Implante em sua integral ide; **B.** Imagem representativa da superfície CONV com aumento de 5000 X e **C.** Imagem representativa da superfície TERPY com aumento de 5000 X.

Não foram observadas alterações significativas entre as imagens aproximadas, o que pode ou não ser efeito da adsorção do fármaco, uma vez que a quantidade de TERPY (10µM) pode não provocar alterações perceptíveis na superfície do implante, considerando o limite de detecção do equipamento.

Para os espectros de EDS da amostra para a superfícies avaliadas, a superfície CONV apontou que a amostra é constituída pelos elementos titânio, alumínio e vanádio; além desses elementos, em um dos espectros o elemento oxigênio também se fez presente, possivelmente, devido à oxidação do titânio. Já a superfície TPY (-), caracterizou-se pela presença de rutênio, além dos demais elementos observados na amostra controle; a TERPY é composta de carbono, o que justifica o carbono detectado ser proveniente do tratamento do implante junto ao oxigênio, resultando a oxidação do titânio.

3.3.2 Espectroscopia na região do UV-Vis

A tabela 2 apresenta a quantificação da TERPY adsorvida sobre a superfície do implante. O resultado obtido foi para apenas uma medida devido a quantidade limitada

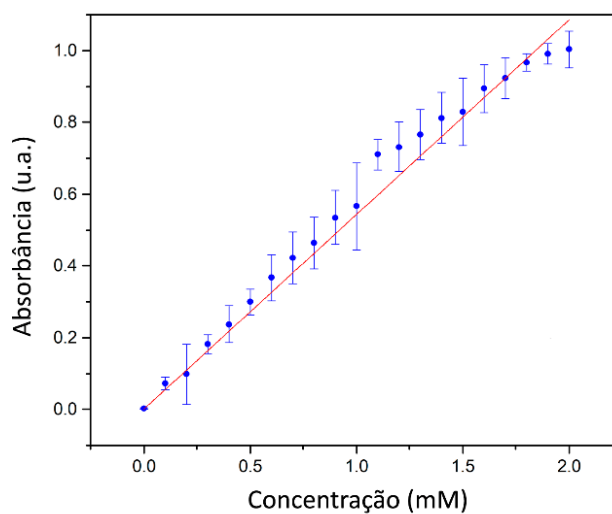
disponível do fármaco *in natura*. Já a figura 5 representa a curva quantificação espectrofotométrica para a análise de da adsorção da TERPY sobre a superfície.

TABELA 2 – Quantificação de TERPY adsorvida na superfície do implante

<i>Amostra</i>	<i>Módulo da média da absorbância (u. a.)</i>	<i>Média da concentração adsorvida (mM)</i>	<i>Massa adsorvida/área geométrica (g/m²)</i>
Controle	0.000	0.000	0.000
TPY (-)	0.791	0.671	0.013 ± 0.000

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

FIGURA 5 – Curva de calibração para TPY (-)



Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho, co-orientador do estudo (2021).

3.4 Experimentos *in vivo*

Com base nos resultados dos experimentos *in vitro*, foi confirmada a melhor concentração de TERPY (10 μ M) para a funcionalização da superfície dos implantes utilizados nesse estudo, viabilizando os experimentos *in vivo*. A partir desta fase, os grupos referentes a essa superfície serão denominados “SHAM TERPY”, “OVX SM TERPY” e “OVX SM RIS TERPY”.

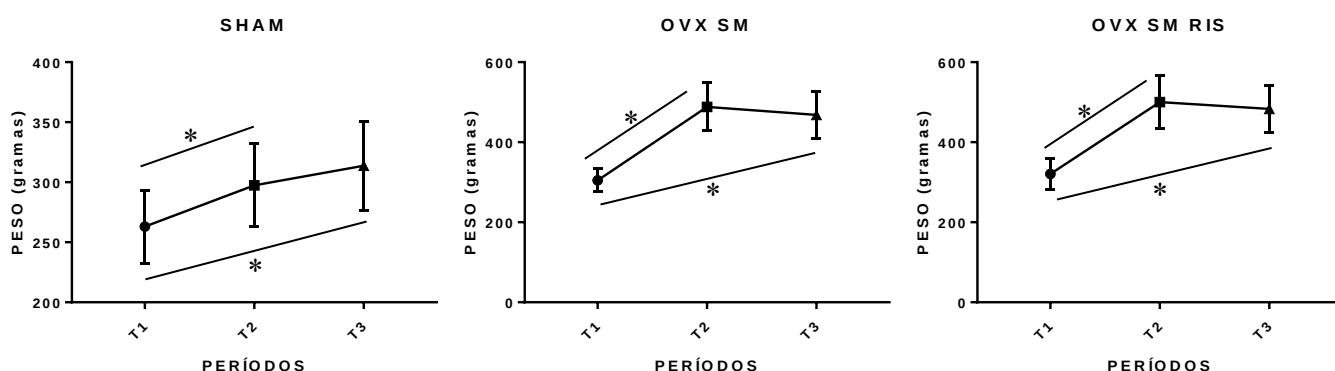
3.4.1 Síndrome metabólica

Conforme o delineamento experimental, os dados clínicos referentes ao controle de peso, glicemia e índice de Lee foram coletados em todos os animais, de acordo com os períodos T1 (antes da cirurgia fictícia ou ovariectomia), T2 (antes da exodontia/instalação dos implantes) e T3 (antes da eutanásia), que foram critérios para caracterizar a síndrome metabólica, independente do tratamento de superfície dos implantes (SHAM, OVX SM e OVX SM RIS).

3.4.2 Peso

Nos grupos OVX SM e OVX SM RIS verifica-se um aumento significativo do peso dos animais do período T1 para T2, com certa estabilidade de T2 para T3. Para todos os grupos, houve diferença estatisticamente significante entre os períodos T1 e T2 ($p=0,0001$), e entre T1 e T3 ($p=0,0001$) (Figura 6).

FIGURA 6 – Peso corporal em T1, T2 e T3



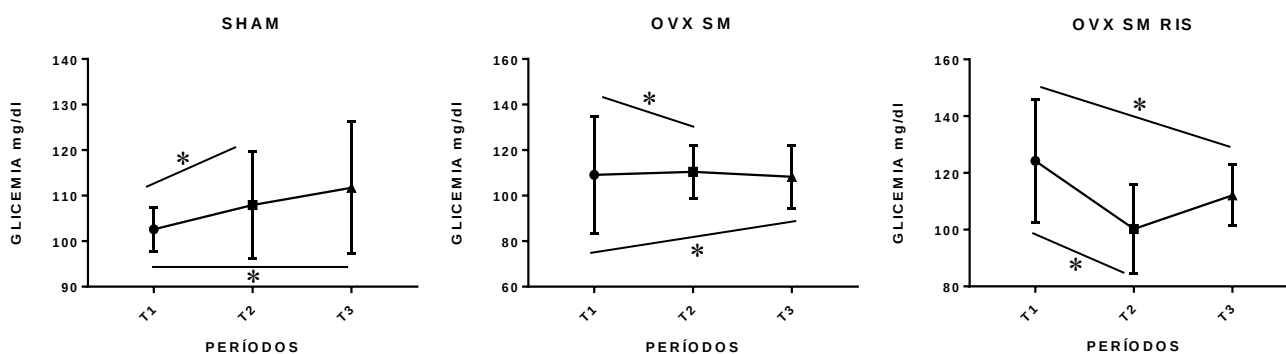
Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre T1 e T2, e T1 e T3 em todos os grupos – Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Já os grupos OVX SM e OVX SM RIS obtiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao peso corporal de SHAM, com valores de $p = 0,0001$ (pós-teste de Tukey) nas duas comparações.

3.4.3 Glicemia

No grupo SHAM, os valores de glicemia se apresentaram de maneira crescente de T1 a T3. Já para OVX SM, nesse mesmo período, os valores exibiram certa constância. Para o grupo OVX SM RIS, de T1 para T2, foi verificada uma queda na glicemia dos animais, com discreto aumento nos valores de T2 para T3. Para todos os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos T1 e T2 ($p = 0,0127$), e entre T1 e T3 ($p = 0,0004$) (Figura 7).

Figura 7 – Glicemia em T1, T2 e T3



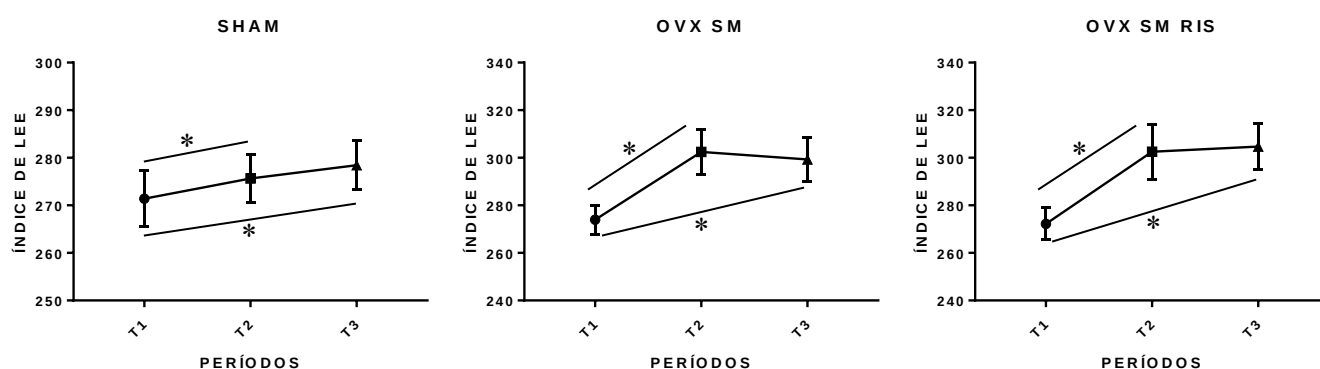
Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre T1 e T2, e T1 e T3 em todos os grupos – Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os grupos OVX SM e OVX SM RIS obtiveram diferença estatisticamente significativa com valores de $p = 0,0018$ (pós-teste de Tukey).

3.4.4 Índice de Lee

Para SHAM, o índice de Lee no período de T1 a T3 obteve uma linha discretamente ascendente, enquanto que, tanto para OVX SM e OVX SM RIS, houve um aumento nos valores médios de T1 a T2 e constância de T2 a T3. Para todos os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos T1 e T2 ($p=0,0001$), e entre T1 e T3 ($p=0,0001$) (Figura 8).

FIGURA 8 – Índice de Lee em T1, T2 e T3



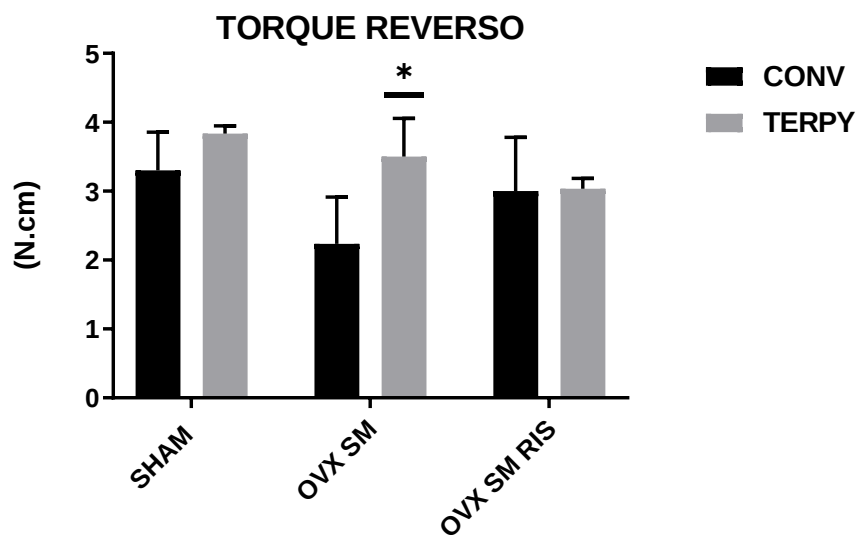
Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre T1 e T2, e T1 e T3 em todos os grupos – Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p<0,05$).

Os grupos OVX SM e OVX SM RIS obtiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados índice de Lee de SHAM, com valores de $p=0,0001$ (pós-teste de Tukey) nas duas comparações.

3.5 Análise Biomecânica – Torque reverso

Foi observado um aumento no torque de remoção dos implantes ao grupo OVX SM TERPY quando comparado a OVX SM CONV ($p=0,0402$). Vale ressaltar que a superfície TERPY favoreceu o torque de remoção dos implantes nos outros grupos tratados (SHAM TERPY e OVX SM RIS TERPY), visto que tiveram melhores valores do que os grupos com instalação do implante convencional (Gráfico 5).

GRÁFICO 5 – Biomecânica



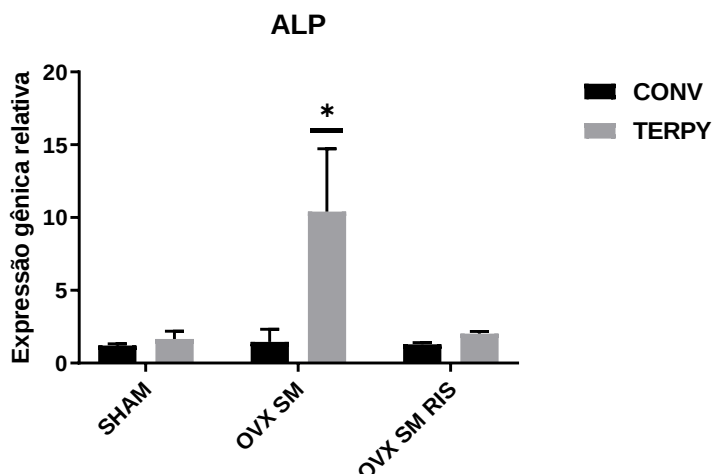
Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa em OVX SM TERPY em relação a todos os grupos – Two-way ANOVA e pós-teste de Sidak ($p<0,05$).

3.6 Análise de PCR em tempo real

3.6.1 Fosfatase Alcalina (ALP)

Para a expressão relativa do gene ALP, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p=0,0048$), com diferença estatisticamente significativa para OVX SM TERPY quando comparado a SHAM CONV ($p=0,0004$) (Gráfico 6).

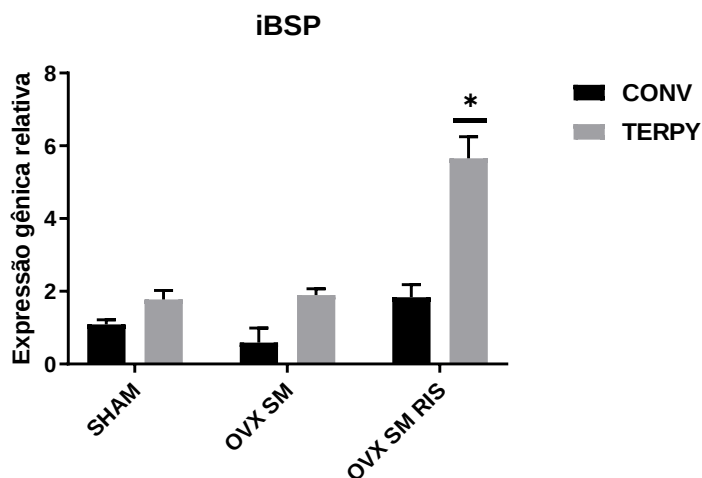
GRÁFICO 6 – PCR em tempo real para ALP



Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre OVX SM TERPY comparada a SHAM CONV – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p<0,05$).

3.6.2 Sialoproteína óssea (iBSP)

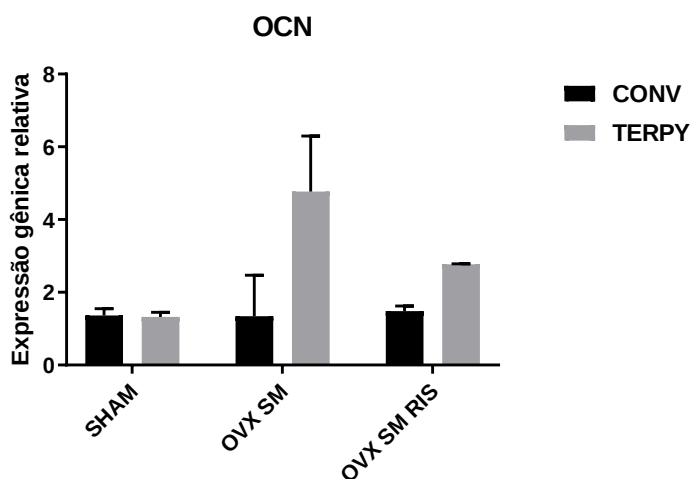
A expressão relativa para o gene de iBSP, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p<0,0001$), com diferença estatisticamente significativa para OVX SM RIS TERPY quando comparado a SHAM CONV ($p=0,028$) (Gráfico 7).

GRÁFICO 7 – PCR em tempo real para iBSP

Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre OVX SM RIS TERPY comparada a SHAM CONV – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.6.3 Osteocalcina (OCN)

Na expressão relativa do gene para OCN, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p = 0,0002$). Não houve com diferença estatisticamente significativa (Gráfico 8).

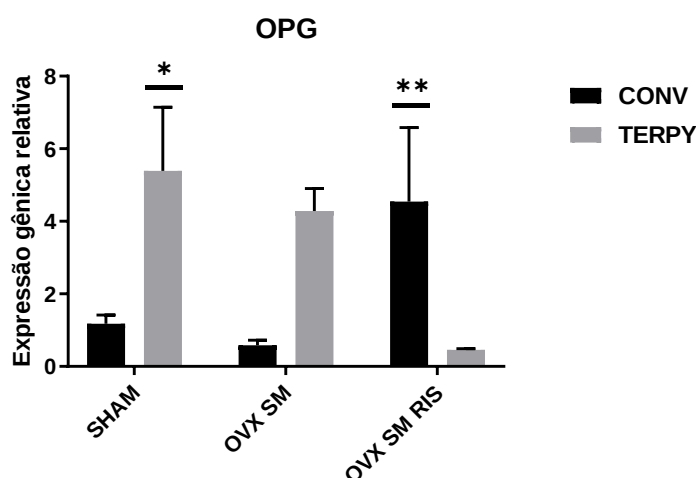
GRÁFICO 8 – PCR em tempo real para OCN

Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). PCR em tempo real para OCN. Não houve diferença estatisticamente significativa.

3.6.4 Osteoprotegerina (OPG)

Para a expressão relativa de OPG, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p < 0,0001$). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre SHAM CONV e OVX SM RIS CONV ($p = 0,0408$), e entre SHAM CONV e SHAM TERPY ($p = 0,0096$) (Gráfico 9).

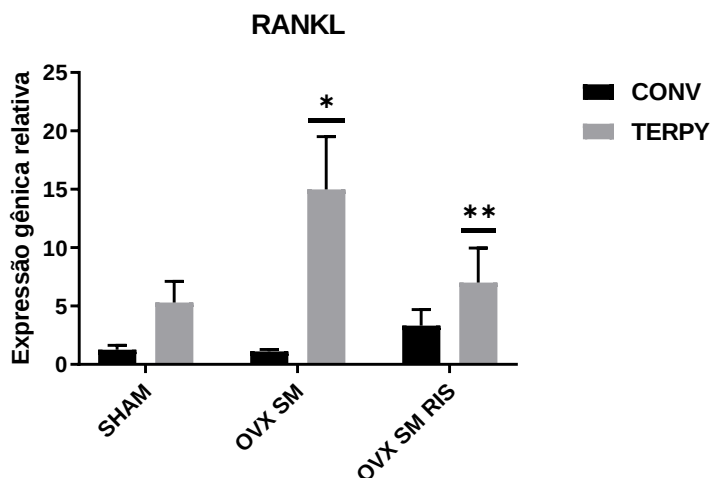
GRÁFICO 9 – PCR em tempo real para OPG



Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre SHAM CONV vs OVX SM RIS CONV e SHAM TERPY – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.6.5 Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL)

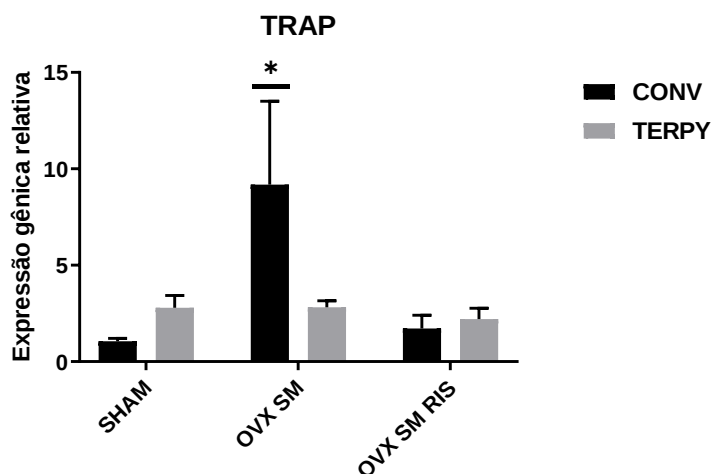
Para a expressão relativa de OPG, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p = 0,0001$). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre SHAM CONV e OVX SM TERPY ($p = 0,0001$), e entre SHAM CONV e OVX SM RIS TERPY ($p = 0,0171$). Os valores superiores para o grupo ovariectomizado não tratado com instalação da superfície TERPY (OVX SM TERPY) corroboram com os achados iBSP para esse mesmo grupo, que podem indicar um melhor início da deposição da matriz óssea extracelular, bem como do turnover ósseo para essa superfície (Gráfico 10).

GRÁFICO 10 – PCR em tempo real para RANKL

Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre SHAM CONV vs OVX SM TERPY e OVX SM RIS TERPY – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.6.6 Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico (TRAP)

Para a expressão relativa de TRAP, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p = 0,0005$). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre SHAM CONV e OVX SM CONV ($p = 0,0002$), indicando uma maior atividade osteoclástica para o grupo osteoporótico não tratado e instalação de implante de superfície convencional (Gráfico 11).

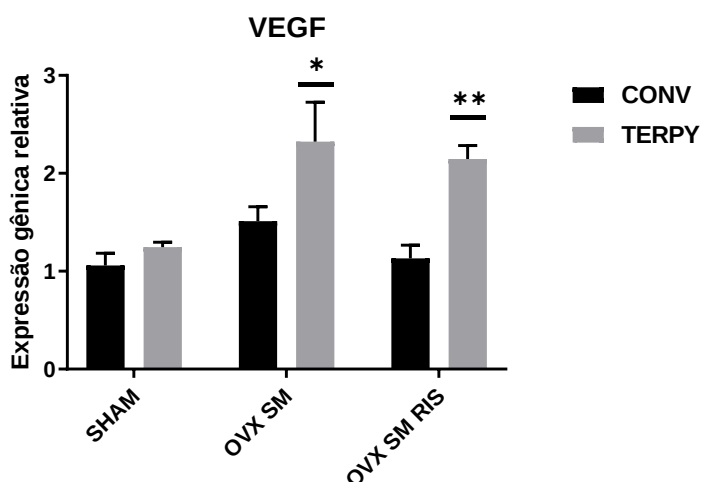
GRÁFICO 11 – PCR em tempo real para TRAP

Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre SHAM CONV e OVX SM CONV – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.6.7 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Na expressão relativa do gene para VEGF, foi observada interação entre os fatores “superfície” e “condição sistêmica” ($p=0,0016$). A diferença estatisticamente significativa foi observada para o grupo SHAM CONV quando comparado a OVX SM TERPY ($p=0,0126$) e OVX SM RIS TERPY ($p=0,0332$). Os maiores valores absolutos para OVX SM TERPY parecem controversos, porém, indicam que, mesmo na ausência do tratamento, a superfície funcionaliza favorece um potencial angiogênico na interface osso-implante, o que é confirmado a partir dos valores de OVX SM RIS TERPY, indicando que, tanto em relação ao grupo controle quanto para a superfície convencional, há um sinergismo entre o fármaco e a superfície TERPY (Gráfico 12).

GRÁFICO 12 – PCR em tempo real para VEGF

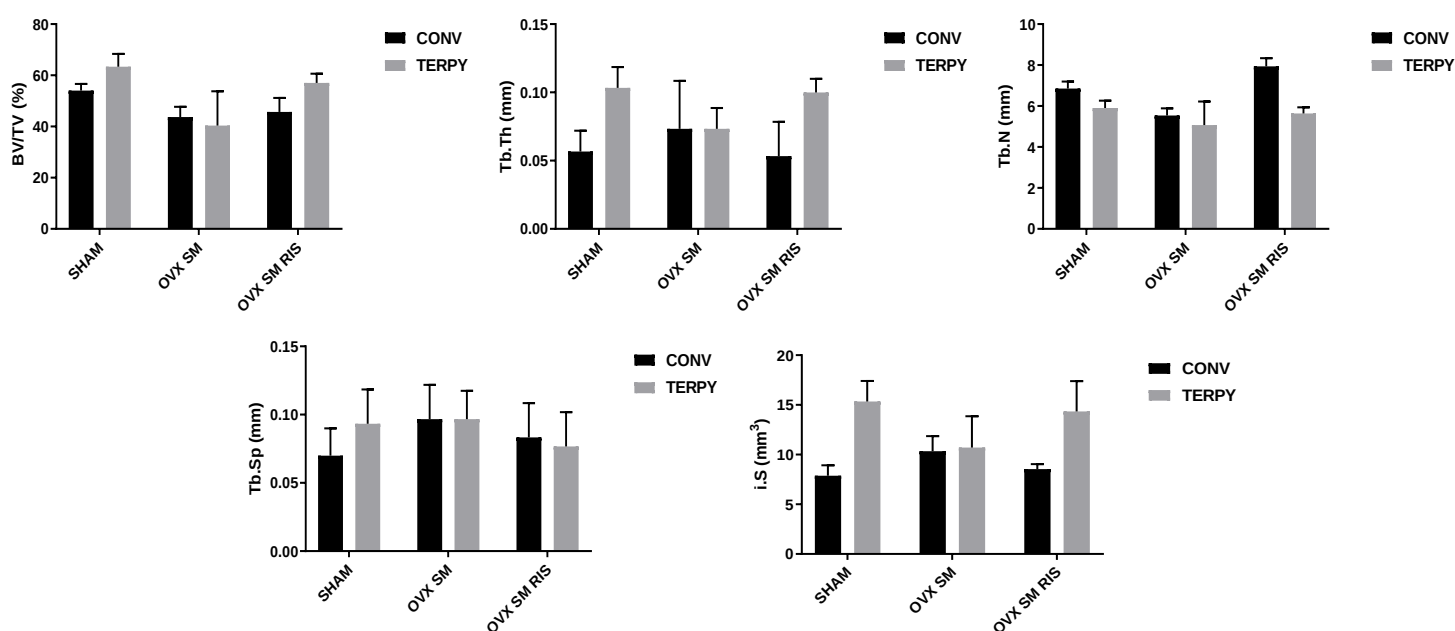


Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre SHAM CONV vs OVX SM TERPY e OVX SM RIS TERPY – Two-way ANOVA e pós-teste de Dunnett ($p<0,05$).

3.7 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a análise de Micro-CT, somente para o fator “condição sistêmica” ($p=0,0237$). Quanto aos valores médios absolutos, verifica-se que para o volume ósseo (BV/TV), o grupo OVX SM RIS se assemelhou ao grupo SHAM, exibindo ainda que a superfície TERPY promoveu maiores valores para esse parâmetro, confirmado pela espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e superfície de intersecção (i.S), solidificando o sinergismo entre o risedronato e essa superfície, uma vez que os valores do grupo osteoporótico tratado se equiparam às condições sistêmica de normalidade (Figura 9).

FIGURA 9 – Parâmetros da análise de Micro-CT

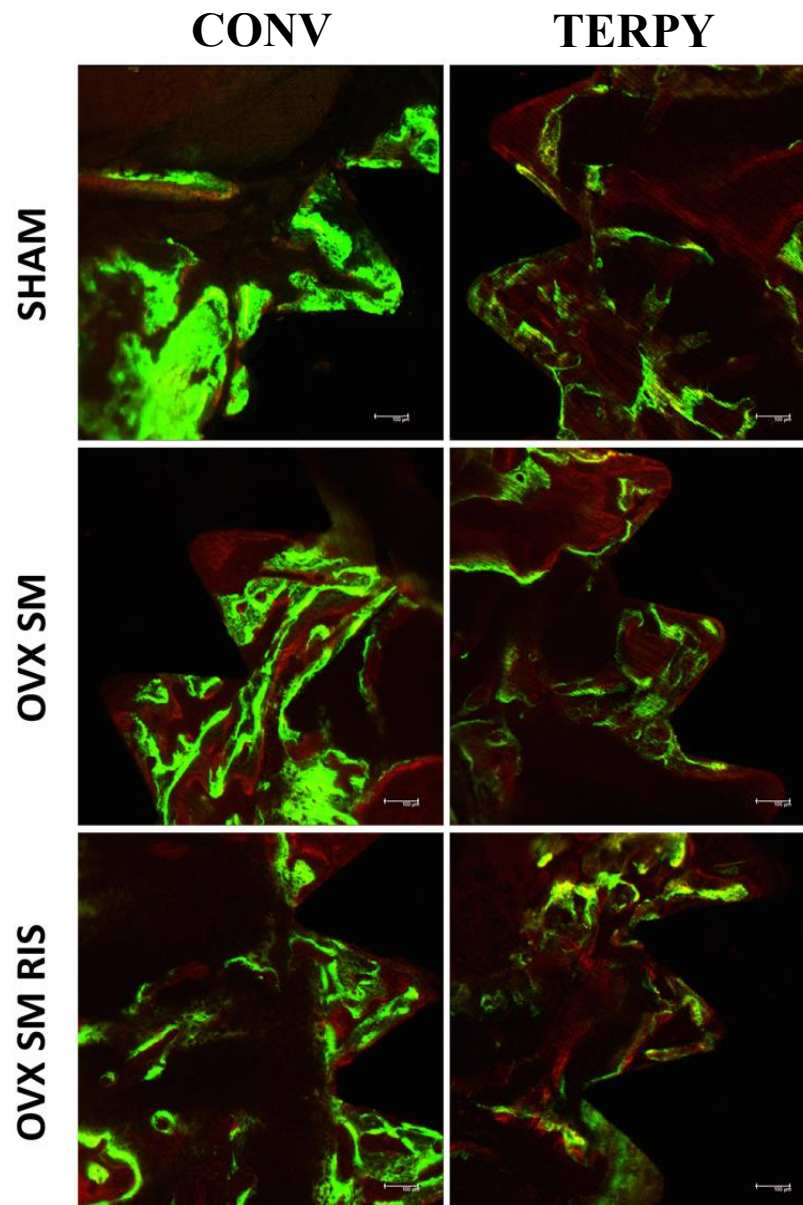


Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Volume ósseo (BV/TV), Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), Número de trabéculas (Tb.N), Separação de trabéculas (Tb.Sp) e Superfície de intersecção (i.S). Não houve diferença estatisticamente entre a condição sistêmica, uso ou não do fármaco e as diferentes superfícies.

3.8 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)

Em função do delineamento experimental proposto neste estudo, a coloração verde (calceína) refere-se ao osso antigo (fluorocromo injetado inicialmente) e a coloração vermelha (alizarina) refere-se ao osso novo (fluorocromo injetado por último) (Figura 10). Os valores numéricos representam a área de osso formada a partir da precipitação de cálcio na matriz óssea.

FIGURA 10 – Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para todos os grupos e suas respectivas superfícies

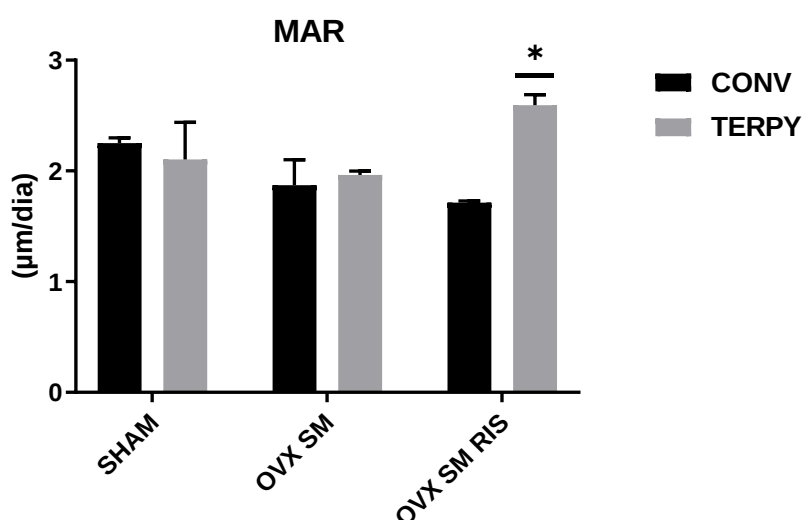


Fonte: Elaborado pelo Autor (2021). Imagens sobrepostas de ambos os fluorocromos para todos os grupos e suas respectivas superfícies.

3.8.1 Taxa de Aposição Mineral Diária (MAR)

Os valores para a MAR revelaram interação entre os parâmetros “superfície” e “condição sistêmica” ($p=0,0004$). Houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies CONV e TERPY para o grupo OVX SM RIS ($p=0,052$). Esses dados sugerem um sinergismo entre a superfície e o risedronato durante a aposição mineral óssea diária, já que os maiores valores absolutos se dão para esse grupo (OVX SM RIS TERPY) e ainda, que a superfície possa favorecer esta ação devido a um melhor valor médio obtido para o grupo OVX SM TERPY quando comparado a OVX SM CONV, corroborando com os achados da análise microtomográfica (Gráfico 13).

Gráfico 13 – MAR

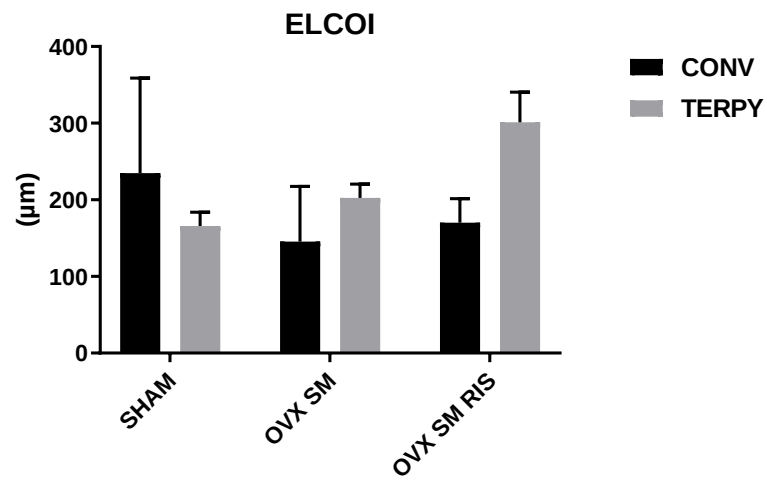


Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). Diferença estatisticamente significativa entre CONV e TERPY para OVX SM RIS – Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($p<0,05$).

3.8.2 Extensão linear de contato osso-implante (ELCOI)

A quantificação da extensão linear de contato osso-implante revelou interação entre os parâmetros “superfície” e “condição sistêmica” ($p=0,0486$), porém, sem diferenças estatisticamente significantes. Foram revelados maiores valores absolutos para a superfície funcionalizada nos grupos osteoporóticos tanto tratados (OVX SM RIS TERPY) quanto não tratados (OVX SM TERPY), validando os achados para esses mesmos grupos quanto à MAR (Gráfico 14).

GRÁFICO 14 – ELCOI



Fonte: GraphPad Prism 7.03 (2021). ELCOI. Não houve diferença estatisticamente entre a condição sistêmica, uso ou não do fármaco e as diferentes superfícies.

4 DISCUSSÃO

O modelo experimental selecionado visou mimetizar os efeitos deletérios ocasionados pela osteoporose, a partir da cirurgia de ovariectomia associada à dieta de cafeteria, a fim de induzir a síndrome metabólica; nesse estudo, os animais foram caracterizados como portadores de deficiência de estrógeno, fator predisponente para caracterização da osteoporose [64,65]. Além da privação de estrógeno, o período pós-menopausa provoca alterações como aumento do percentual de gordura visceral, resistência à insulina e dislipidemias, alterações diretamente correlacionadas à síndrome metabólica [66] e situações sistêmicas interrelacionadas amplamente observadas durante o manejo do paciente na prática clínica [66,67]. Para tanto, houve a necessidade de padronização da dieta de cafeteria administrada nos animais para a simulação dessa condição [54,55].

Os níveis de glicemia avaliados, não mostraram diferença estatisticamente significativa, no entanto, os maiores valores iniciais desse parâmetro nos grupos OVX SM e OVX SM RIS sugerem o início de uma condição de resistência à insulina em função da dieta hipercalórica. Quanto ao peso dos animais, foi possível observar que a remoção dos ovários potencializou tanto o ganho peso corporal, quanto a caracterização da obesidade a partir do índice de Lee para OVX SM e OVX SM RIS, os quais apresentaram maiores valores absolutos para esses parâmetros, dando-lhes a condição mimetizada de síndrome metabólica, uma vez que a obesidade é um componente primordial desta patologia [68], validada pela diferença estatística desses dois grupos quando comparados a SHAM, e ainda corroborando com achados na literatura, onde a dieta de cafeteria também revelou valores superiores de peso corporal, gordura subcutânea e gordura retroperitoneal em ratos eutanasiados aos 100 dias pós-operatórios [69]. No presente estudo, os períodos de avaliação clínica foram pontuais, e, devido ao tempo de execução do experimento, os animais apenas mimetizaram a condição de síndrome metabólica, ainda que dados da literatura demonstrem que a dieta hiperglicídica leva ao aumento da glicemia de jejum em ratos *Wistar* [70], que a resistência insulínica seja considerada como base fisiopatológica da síndrome metabólica [71], e que a obesidade visceral é um sinal clínico da resistência à insulina, embora esta possa existir desacompanhada de aumento de peso [68].

Estudos desenvolvidos onde a presença ou ausência da síndrome metabólica foram comparadas validam que essa alteração desenvolve papel fundamental sobre o metabolismo do tecido ósseo; há resultados controversos do efeito da síndrome metabólica sobre a densidade óssea [66,72]. O risedronato de sódio foi o fármaco escolhido por ser considerado o

mais comumente utilizado, junto ao alendronato de sódio, fármaco com efeitos bem descritos sobre sua ação quanto ao reparo alveolar e peri-implantar [73-75], tornando-se pertinente o estudo de outro bifosfonato para o delineamento experimental.

O risedronato de sódio é um bifosfonato oral amplamente prescrito para o tratamento da osteoporose pós-menopáusica [76]. Estudos demonstraram sua expressiva eficácia na prevenção de fraturas em mulheres nessa fase [77] através do seu mecanismo de ação antirreabsortivo, que atua reduzindo a taxa de remodelação óssea e suprimindo a ação osteoclástica. Embora seja favorável na prevenção de fraturas e manutenção de densidade mineral óssea, o uso dos bifosfonatos tem sido associado ao desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares, uma vez que esses agentes podem diminuir o suprimento sanguíneo através da indução de apoptose celular endotelial, prejudicando a angiogênese [21,78,79]; além disso, a ausência da diferenciação e função dos osteoclastos afeta a liberação de citocinas e fatores de crescimento derivados de osteoclastos responsáveis por ativar a formação óssea [78,79]. Dessa forma, o uso desse fármaco pode inibir o *turnover* ósseo e, em relação a dose, período de uso e comorbidades imunossupressoras, pode levar ao quadro de osteonecrose [80,81]. A principal hipótese levantada nesse estudo é de que se a superfície do implante funcionalizada com a TERPY, liberada localmente, poderia melhorar a dinâmica do metabolismo ósseo peri-implantar e seu consequente reparo em indivíduos que fazem uso de bifosfonatos.

O modelo de instalação de implante imediato após exodontia do primeiro molar superior em maxila de ratas foi escolhido, onde o período de 28 dias de experimento reflete diretamente em menores interferências externas sobre o processo de reparo, e ainda, levando-se em consideração que a ocorrência da queda do torque reverso aos 42 dias pós-operatórios evidencia a coexistência de uma fator crítico que altera consideravelmente a estabilidade secundária, aumentando drasticamente a possibilidade de falha da osseointegração [82]. O período de 28 dias apresenta-se como opção segura e sensata para o estudo da osseointegração, sendo considerado um modelo experimental viável pela literatura [56,82,83].

A associação entre o fármaco administrado sistemicamente para o tratamento de osteoporose (risedronato) junto a uma biomolécula sobre a superfície dos implantes, com o objetivo de melhorar o processo de reparo peri-implantar sem que houvesse prejuízo na densidade mineral óssea, a TERPY, desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Analítica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto [84], foi eleita devido a sua propriedade doadora de óxido nítrico e sua potencial manutenção da vascularização no sítio reparacional, que poderia estar prejudicado pela utilização do antirreabsortivo [27,85].

Os resultados das culturas de células foram fundamentais para a seleção da concentração da TERPY. A partir do conjunto de dados avaliados, a substância de menor concentração mostrou-se mais efetiva e com menor genotoxicidade celular. Poucas diferenças foram observadas entre as duas concentrações avaliadas e, assim, a menor concentração do fármaco foi selecionada (10 μ M) para a realização dos experimentos *in vivo*, principalmente por ser o primeiro estudo conduzido no LSMT com esse design experimental [46].

Os dados da análise biomecânica por torque reverso foram melhores para superfície TERPY em todos os grupos experimentais, conferindo um maior contato osso-implante e estabilidade aos 28 dias pós-operatórios. O grupo OVX SM TERPY apresentou maiores valores durante a remoção dos implantes, validando a possível maturação do grau de mineralização do tecido ósseo peri-implantar da superfície tratada com o agente local, diante dos efeitos deletérios da alteração sistêmica mimetizada. Um estudo pregresso evidenciou o baixo torque de remoção frente a utilização de alendronato de sódio [75], os valores obtidos foram muito próximos dos observados nos animais portadores de osteoporose; esse aspecto não foi confirmado nesse estudo, uma vez que OVX SM RIS mostrou maiores valores absolutos quando comparado ao animal com comprometimento sistêmico (OVX SM) sem tratamento com o risedronato.

Os resultados referentes a microarquitetura óssea apresentados não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes. Parâmetros relacionados à caracterização das trabéculas (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp) mostraram-se semelhantes em todos os grupos e superfícies avaliadas. Um aumento de volume ósseo (BV/TV) foi observado em torno dos implantes funcionalizados com TERPY em SHAM e OVX SM RIS, conforme determinado pela histomorfometria; mesmo que sem diferença estatística, corrobora com achados que sustentam a ação de manutenção do tecido ósseo associado ao uso do risedronato de sódio [86], a superfície TERPY de ação local pareceu melhorar esse parâmetro [87]. O risedronato de ação sistêmica sugere ação sinérgica com a superfície funcionalizada durante a modulação de fatores celulares que agem via sinalização autócrina/parácrina para indução da formação óssea local [88,89], ao passo de que os resultados do parâmetro superfície de intersecção (i.S) também evidenciaram maiores valores para a superfície TERPY em relação ao contato osso-implante para o grupo SHAM e OVX SM RIS, sustentando essa hipótese e revalidando os achados de expressão gênica da proteína OPG para SHAM TERPY, onde sugere-se um melhor início da precipitação mineral óssea para essa superfície, assim como para expressão de iBSP no grupo OVX SM RIS TERPY. Ademais, essa premissa justifica um padrão de formação óssea peri-implantar no grupo SHAM e OVX SM RIS, com tendência ao

desenvolvimento de trabéculas mais espessas quando utilizado o implante funcionalizado com a TERPY, mantendo-se de maneira constante quanto ao número e separação de trabéculas ósseas aos 28 dias pós-operatórios. Quanto a SHAM e OVX SM RIS, os valores médios absolutos de volume ósseo (BV/TV) foram semelhantes, com aumento para a superfície TERPY nesses dois grupos, confirmados pela espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e superfície de intersecção (i.S), solidificando a ação do risedronato de sódio [86] e seu sinergismo com a superfície TERPY, uma vez que os valores do grupo OVX SM RIS se equiparam às condições sistêmica de normalidade (SHAM).

Os resultados da dinâmica óssea através das marcações com fluorocromos, reafirmam que a associação fármaco sistêmico e funcionalização local tiveram um efeito sinérgico que contribuiu para a melhora no *turnover* ósseo peri-implantar, sendo possível notar a melhora na precipitação mineral diária quando houve a funcionalização da superfície dos implantes, especialmente no grupo OVX SM RIS. Portanto, os resultados apresentados referentes ao *turnover* ósseo e a dinâmica do tecido ósseo mostraram que, localmente, a biomolécula foi capaz de ativar respostas celulares que mantiveram a precipitação mineral junto à superfície dos implantes. Quanto ao grupo OVX SM, na presença da superfície TERPY, houve um aumento nos valores absolutos na extensão linear de contato osso-implante (ELCOI) e valores constantes de taxa de aposição mineral diária (MAR) quando comparado a SHAM, caracterizando uma melhora nos parâmetros do tecido ósseo reparacional avaliados, apontando um papel significativo dessa biomolécula na presença da alteração sistêmica sem o tratamento com o bifosfonato.

A resposta antirreabsortiva local promovida pelo risedronato administrado sistemicamente parece ter sido melhorada na superfície funcionalizada, devido aos resultados observados na expressão de genes que estão envolvidos na remodelação óssea. Dessa maneira, na presença da superfície funcionalizada, a expressão iBSP e OCN foi discretamente aumentada, além de equilíbrio entre OPG e RANKL para OVX SM RIS, e, para OVX SM TERPY, um aumento significativo para ALP e também um discreto aumento para iBSP e OCN e equilíbrio entre OPG e RANKL, favorecendo a afirmação de que a superfície funcionalizada parece ter efeitos benéficos no reparo peri-implantar, uma vez o aumento da expressão da TRAP para o grupo OVX SM CONV corrobora com essa proposição, assim como os dados obtidos a partir da MAR e ELCOI para OVX SM TERPY e OVX SM RIS TERPY. Quanto a VEGF, observou-se um aumento significativo na presença da TERPY. Os maiores valores absolutos dessa proteína para OVX SM TERPY parecem controversos, porém, indicam que, mesmo na ausência do tratamento, a superfície funcionaliza favorece um

potencial angiogênico na interface osso-implante, o que é confirmado a partir dos valores de OVX SM RIS TERPY, tendo a TERPY como um doador óxido nítrico que pode modular a atividade da óxido nítrico-sintase endotelial, sendo esta uma das isoformas mais relevantes durante o processo de reparo ósseo [90], com ampla expressão em células no estroma de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos [91], reforçando a atividade síncrona entre o fármaco e a superfície funcionalizada. Não obstante, o efeito antirreabsortivo do risedronato de sódio pareceu ser amenizado pela biomolécula devido ao aumento na expressão do gene VEGF, legitimando a atuação da TERPY no sítio reparacional, uma vez que o óxido nítrico é regulador dos eventos fitopatológicos da angiogênese e que a óxido nítrico-sintase endotelial atua sobre o *turnover* ósseo mantendo a integridade desse tecido [90,92,93].

Na comparação das superfícies, a TERPY revelou um desempenho favorável através da histomorfometria, expressão gênica, torque reverso e pela dinâmica óssea de fluorocromos. Essa última análise indica que a atividade do tecido ósseo é preservada quando a TERPY é incorporada à superfície dos implantes e que mesmo na presença do bifosfonato, seu *turnover* é mantido. Ainda, a biomolécula promoveu estímulos locais no sítio reparacional que pareceram diminuir o efeito antirreabsortivo do risedronato, inibindo seus efeitos antiangiogênicos e de supressão osteoclástica, beneficiando a osseointegração dos implantes instalados [20, 21, 79, 94].

5 CONCLUSÃO

Com base nas análises *in vivo*, pode-se concluir que a TERPY é uma biomolécula que estimula a precipitação mineral de forma positiva sobre o reparo peri-implantar quando comparada à superfície convencional e, frente à deficiência de estrógeno, age sinergicamente ao risedronato de sódio, inibindo seus efeitos sobre o metabolismo ósseo e favorecendo a osseointegração de implantes instalados em animais comprometidos sistemicamente.

REFERÊNCIAS

- 1- de Quadros VP, Tobar N, Viana LR, Dos Santos RW, Kiyataka PHM, Gomes-Marcondes MCC. The 17 β -oestradiol treatment minimizes the adverse effects of protein restriction on bone parameters in ovariectomized Wistar rats: Relevance to osteoporosis and the menopause. *Bone Joint Res.* 2020 Jan 8;8(12):573-581. doi: 10.1302/2046-3758.812.BJR-2018-0259.R2.
- 2- Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.* 2012 Jun;61(6):1315-22. doi: 10.2337/db11-1300.
- 3- Jones CM, Boelaert K. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;61(4):291-300. doi: 10.1159/000367692.
- 4- Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1186-94. doi: 10.1172/JCI28550.
- 5- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Nov;23(11):576-81. doi: 10.1016/j.tem.2012.03.008.
- 6- Anil S, Preethanath RS, AlMoharib HS, Kamath KP, Anand PS. Impact of osteoporosis and its treatment on oral health. *Am J Med Sci.* 2013 Nov;346(5):396-401. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31828983da.
- 7- Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids.* 2015 Jul;99(Pt A):11-5. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.010.
- 8- Warren MP, Shu AR, Dominguez JE. Menopause and hormone replacement. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth: MDText.com; 2015 [citado 2021 jun 6]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279050/>.
- 9- Qi S, Zheng H. Combined Effects of Phytoestrogen Genistein and Silicon on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rat. *Biol Trace Elem Res.* 2017 Jun;177(2):281-287. doi: 10.1007/s12011-016-0882-1.
- 10- Rodriguez-Cano A, Mier-Cabrera J, Balas-Nakash M, Muñoz-Manrique C, Legorreta-Legorreta J, Perichart-Perera O. Dietary changes associated with improvement of metabolic syndrome components in postmenopausal women receiving two different nutrition interventions. *Menopause.* 2015 Jul;22(7):758-64. doi: 10.1097/GME.0000000000000400.

- 11- Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev.* 2013 Jun;34(3):309-38. doi: 10.1210/er.2012-1055.
- 12- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol.* 2012 Jan;212(1):3-12. doi: 10.1530/JOE-11-0044.
- 13- Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.* 2011 Jun 15;6:30. doi: 10.1186/1749-799X-6-30.
- 14- Liu PY, Ilich JZ, Brummel-Smith K, Ghosh S. New insight into fat, muscle and bone relationship in women: determining the threshold at which body fat assumes negative relationship with bone mineral density. *Int J Prev Med.* 2014 Nov;5(11):1452-63.
- 15- Park YM, Padilla J, Kanaley JA, Zidon TM, Welly RJ, Britton SL, Koch LG, Thyfault JP, Booth FW, Vieira-Potter VJ. Voluntary Running Attenuates Metabolic Dysfunction in Ovariectomized Low-Fit Rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2017 Feb;49(2):254-264. doi: 10.1249/MSS.0000000000001101.
- 16- Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging.* 2015 Mar 20;10:583-91. doi: 10.2147/CIA.S54614.
- 17- Ferreira Junior CD, Casado PL, Barboza LSP. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na odontologia. *Rev Periodontia.* 2007;17(4):24-30.
- 18- Shigematsu T, Muraoka R, Sugimoto T, Nishizawa Y. Risedronate therapy in patients with mild-to-moderate chronic kidney disease with osteoporosis: post-hoc analysis of data from the risedronate phase III clinical trials. *BMC Nephrol.* 2017 Feb 15;18(1):66. doi: 10.1186/s12882-017-0478-9.
- 19- Holtmann H, Lommen J, Kübler NR, et al. Pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw: a comparative study of in vivo and in vitro trials. *J Int Med Res.* 2018;46(10):4277-4296. doi:10.1177/0300060518788987.
- 20- Stresing V, Fournier PG, Bellahcène A, Benzaïd I, Mönkkönen H, Colombel M, Ebetino FH, Castronovo V, Clézardin P. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone.* 2011 Feb;48(2):259-66. doi: 10.1016/j.bone.2010.09.035.
- 21- Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-

- 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
- 22- Farhad AR, Razavi SM, Rozati AR, Shekarchizade N, Manshaei M. Selective nitric oxide synthase inhibitor promotes bone healing. *Dent Res J (Isfahan).* 2017 Sep-Oct;14(5):306-313. doi: 10.4103/1735-3327.215965.
- 23- Song GG, Lee YH. Association of eNOS polymorphisms with susceptibility to osteonecrosis of the femur head: A meta-analysis. *Z Rheumatol.* 2017 Apr;76(3):267-273. English. doi: 10.1007/s00393-016-0093-3. PMID: 27312465.
- 24- Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar; 1192:391-403. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05230. x.
- 25- Wimalawansa SJ. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov; 1117:283-97. doi: 10.1196/annals.1402.066.
- 26- Lunardi CN, da Silva RS, Bendhack LM. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Jan;42(1):87-93. doi: 10.1590/s0100-879x2009000100013.
- 27- Potje SR, Chen Z, Oliveira SDS, Bendhack LM, da Silva RS, Bonini MG, Antoniali C, Minshall RD. Nitric oxide donor [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production. *Free Radic Biol Med.* 2017 Nov; 112:587-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.004.
- 28- Joshua J, Kalyanaraman H, Marathe N, Pilz RB. Nitric oxide as a mediator of estrogen effects in osteocytes. *Vitam Horm.* 2014; 96:247-63. doi: 10.1016/B978-0-12-800254-4.00010-6.
- 29- Müller F. Interventions for edentate elders--what is the evidence? *Gerodontology.* 2014 Feb;31 Suppl 1:44-51. doi: 10.1111/ger.12083.
- 30- Alghamdi HS, Van Den Beucken JJP, Jansen JA. Osteoporosis–fracture healing and osseointegration. *Drug Discov Today Dis Models.* 2014;13:3-9. doi: 10.1016/j.ddmod.2014.10.001.
- 31- Dudley J. Implants for the ageing population. *Aust Dent J.* 2015 Mar;60 Suppl 1:28-43. doi: 10.1111/adj.12282.
- 32- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Jamil NA, Ima-Nirwana S. Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet in a rat model. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:191-200. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.042.

- 33- Fu SW, Zeng GF, Zong SH, Zhang ZY, Zou B, Fang Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutr Res.* 2014;34(6):467-77. doi: 10.1016/j.nutres.2014.05.003.
- 34- Faverani LP, Polo TO, Ramalho-Ferreira G, Momesso GA, Hassumi JS, Rossi AC, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2017;22:255-65. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2.
- 35- Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(1):42-52.
- 36- Hiyari S, Wong RL, Yaghsezian A, Naghibi A, Tetradis S, Camargo PM, et al. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2018;45(1):89-99. doi: 10.1111/jcpe.12817.
- 37- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011;19(6):1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.
- 38- Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(5):655-67. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.004.
- 39- Andrade GF, Almeida CD, Espeschit AC, Dantas MI, Benjamin LA, Ribeiro SM, et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2013;12:145. doi: 10.1186/1476-511X-12-145.
- 40- Lalanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One.* 2014;9(1):e85049. doi: 10.1371/journal.pone.0085049.
- 41- Goularte JF, Ferreira MB, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr.* 2012;108(8):1511-8. doi: 10.1017/S0007114511006933.
- 42- Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E215-24. doi: 10.1152/ajpendo.00098.2010.

- 43- Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, de Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008 Mar;28(2):205-11. doi: 10.1002/jat.1271.
- 44- International Standard ISO 10993-1 "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process", Disponível em www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance.
- 45- de Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Nov 1;56:538-44. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.026.
- 46- de Camargo Reis Mello D, Rodrigues LM, D'Antola Mello FZ, Gonçalves TF, Ferreira B, Schneider SG, de Oliveira LD, de Vasconcellos LMR. Biological and microbiological interactions of Ti-35Nb-7Zr alloy and its basic elements on bone marrow stromal cells: good prospects for bone tissue engineering. *Int J Implant Dent*. 2020 Oct 25;6(1):65. doi: 10.1186/s40729-020-00261-3.
- 47- Shi Q, Qian Z, Liu D, Liu H. Modificação da superfície do implante de titânio dentário por auto-montagem eletrostática camada a camada. *Front Physiol*. 7 de agosto de 2017; 8: 574. doi: 10.3389 / fphys.2017.00574.
- 48- Trino LD, Bronze-Uhle ES, Ramachandran A, Lisboa-Filho PN, Mathew MT, George A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 May;81:26-38. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.02.024.
- 49- Hernandez-Montelongo J, Corrales Ureña YR, Machado D, Lancelloti M, Pinheiro MP, Rischka K, Lisboa-Filho PN, Cotta MA. Electrostatic immobilization of antimicrobial peptides on polyethylenimine and their antibacterial effect against *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018 Apr 1;164:370-378. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.02.002.
- 50- Trino LD, Dias LFG, Albano LGS, Bronze-Uhle ES, Rangel EC, Graeff CFO, Lisboa-Filho PN. Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. *Ceramics International*. 2018, Mar;44(4):4000-4008.
- 51- Gomes-Ferreira PHS, Lisboa-Filho PN, da Silva AC, Bim-Júnior O, de Souza Batista FR, Ervolino-Silva AC, Garcia-Junior IR, Okamoto R. Sonochemical time standardization for bioactive materials used in periimplantar defects filling. *Ultrason Sonochem*. 2019 Sep;56:437-446. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.032.

- 52-long J.A.; evans H.M. The estorus cycle in the rat and its related phenomena. Mem. Univer.Calif., v. 6, p. 1-148, 1922.
- 53-I toh A, Akagi Y, Shimomura H, Aoyama T. Interaction between Bisphosphonates and Mineral Water: Study of Oral Risedronate Absorption in Rats. Biol Pharm Bull. 2016;39(3):323-8. doi: 10.1248/bpb.b15-00630.
- 54- Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. Free Radic Biol Med. 2013 Dec;65:254-261. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022.
- 55- Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. Physiol Behav. 2016 Dec 1;167:382-391. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029.
- 56- Du Z, Lee RS, Hamlet S, Doan N, Ivanovski S, Xiao Y. Evaluation of the first maxillary molar post-extraction socket as a model for dental implant osseointegration research. Clin Oral Implants Res. 2016;27(12):1469-1478. doi: 10.1111/clr.12571.
- 57- Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, Freire A, Faverani LP, Sumida DH, Okamoto R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. J Appl Oral Sci. 2018; 10;26:e20170470. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0470.
- 58- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 2013; 28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
- 59- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. Clin Oral Investig. 2017;21(5):1485-94. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.
- 60- lowry OH, rosebrough NJ, farr AL, randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.
- 61- do Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VA, Carvalho YR, Cairo CA, de Vasconcellos LM. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene

- expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Nov;26(11):259. doi: 10.1007/s10856-015-5594-0.
- 62- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- 63- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- 64- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012 Sep;Chapter 5:Unit5.61. doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58.
- 65- Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X. In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *PeerJ*. 2017 Sep 13;5:e3697. doi: 10.7717/peerj.3697.
- 66- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*. 2016;8(6):347. Published 2016 Jun 7. doi:10.3390/nu8060347.
- 67- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*. 2016 Jun 7;8(6):347. doi: 10.3390/nu8060347.
- 68- Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):286-8. doi: 10.1161/01.cir.0000019884.36724.d9.
- 69- Sagae SC, Gobo CG, Paz ED, Menegotto JB, Yamashita PK, Franci CR, Balbo SL. Bloqueio do receptor AT1 da Angiotensina II reduz o número de folículos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria [Blockade of AT1 receptor of Angiotensin II reduces the number of antral follicles in female rats with obesity induced by cafeteria diet]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015 Jul;37(7):302-7. Portuguese. doi: 10.1590/S0100-720320150005352.
- 70- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.

- 71- Gaspard U. Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas*. 2009 Apr 20;62(4):362-5. doi: 10.1016/j.maturitas.2008.11.026.
- 72- Xue P, Gao P, Li Y. The association between metabolic syndrome and bone mineral density: a meta-analysis. *Endocrine*. 2012 Dec;42(3):546-54. doi: 10.1007/s12020-012-9684-1.
- 73- Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):255-265. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2.
- 74- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1485-1494. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.
- 75- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jun;44(6):798-805. doi: 10.1016/j.ijom.2015.02.018.
- 76- Kendler DL, Marin F, Zerbini CAF, Russo LA, Greenspan SL, Zikan V, Bagur A, Malouf-Sierra J, Lakatos P, Fahrleitner-Pammer A, Lespessailles E, Minisola S, Body JJ, Geusens P, Möricke R, López-Romero P. Effects of teriparatide and risedronate on new fractures in post-menopausal women with severe osteoporosis (VERO): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet*. 2018 Jan 20;391(10117):230-240. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32137-2.
- 77- Roux C. Ostéoporose postménopausique: les traitements actuels [Postmenopausal osteoporosis: current treatment]. *Rev Med Interne*. 2004 Dec;25 Suppl 5:S568-72. French. doi: 10.1016/s0248-8663(04)80056-0.
- 78- Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clézardin P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6538-44. PMID: 12438248.
- 79- Hoefert S, Sade Hoefert C, Munz A, Schmitz I, Grimm M, Yuan A, Northoff H, Reinert S, Alexander D. Effect of bisphosphonates on macrophagic THP-1 cell survival in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Mar;121(3):222-32.

- 80- Brooks JK, Gilson AJ, Sindler AJ, Ashman SG, Schwartz KG, Nikitakis NG. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Jun;103(6):780-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.10.010.
- 81- Sacco R, Woolley J, Yates J, Calasans-Maia MD, Akintola O, Patel V. The role of antiresorptive drugs and medication-related osteonecrosis of the jaw in nononcologic immunosuppressed patients: A systematic review. *J Res Med Sci.* 2021 Mar 31;26:23. doi: 10.4103/jrms.JRMS_794_20.
- 82- de Souza Batista FR; Ervolino-Silva AC; Pitol-Palin L; Hassumi JS; Monteiro NG; Okamoto R. Immediate implant installation in the maxilla of Wistar rats: description of the technique and definition of the analysis period by removal torque. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 2021. **[No Prelo]**.
- 83- Heo HA, Park SH, Jeon YS, Pyo SW. Enhancing Effect of Intermittent Parathyroid Hormone Administration on Bone Formation After Titanium Implant Placement in an Ovariectomized Rat Maxilla. *Implant Dent.* 2016 Apr;25(2):227-31. doi: 10.1097/ID.0000000000000352.
- 84- de Lima RG, Sauaia MG, Bonaventura D, Tedesco AC, Bendhack LM, da Silva RS. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photo release by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg Chim Acta.* 2006;359:2543–2549 doi: 10.1016 / j.ica.2006.02.020.
- 85- Munhoz FC, Potje SR, Pereira AC, Daruge MG, da Silva RS, Bendhack LM, Antoniali C. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}(+)](3+)$ in spontaneously hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2012 Feb 15;26(2):111-7. doi: 10.1016/j.niox.2011.12.008.
- 86- Ye T, Cao P, Qi J, Zhou Q, Rao DS, Qiu S. Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186012. Published 2017 Oct 18. doi: 10.1371/journal.pone.0186012.
- 87- Potje SR, Chen Z, Oliveira SDS, et al. Nitric oxide donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production. *Free Radic Biol Med.* 2017;112:587-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.004.
- 88- Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, et al. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials.* 2010;31(10):2728-2735. doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2009.12.029Anastasio AT, Paniagua A, Diamond C, Ferlauto HR, Fernandez-Moure JS. Nanomaterial Nitric Oxide Delivery in Traumatic Orthopedic Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:592008. Published 2021 Jan 18. doi:10.3389/fbioe.2020.592008.
- 89- Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials.* 2009 Jul;30(20):3390-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.047.
- 90- Anastasio AT, Paniagua A, Diamond C, Ferlauto HR, Fernandez-Moure JS. Nanomaterial Nitric Oxide Delivery in Traumatic Orthopedic Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:592008. Published 2021 Jan 18. doi:10.3389/fbioe.2020.592008
- 91- Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *ScientificWorldJournal.* 2010 Apr 13;10:624-32. doi: 10.1100/tsw.2010.58.
- 92- Rajendran S, Shen X, Glawe J, Kolluru GK, Kevil CG. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Growth and Remodeling. *Compr Physiol.* 2019;9(3):1213-1247. Published 2019 Jun 12. doi:10.1002/cphy.c180026.
- 93- Afzal F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J Pathol.* 2004 Apr;202(4):503-10. doi: 10.1002/path.1536.
- 94- Guazzo R, Sbricoli L, Ricci S, Bressan E, Piattelli A, Iaculli F. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw and Dental Implants Failures: A Systematic Review. *J Oral Implantol.* 2017 Feb;43(1):51-57. doi: 10.1563/aaid-joi-16-00057.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas a deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com residronato de sódio**", Processo FOA nº 00563-2018, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Setembro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Outubro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Characterization of peri-implant bone tissue against the use of nitric oxide for functionalization of the surface of implants installed in the maxilla of rats induced to estrogen deficiency and metabolic syndrome treated with risedronate sodium**", Protocol FOA nº 00563-2018, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2019.

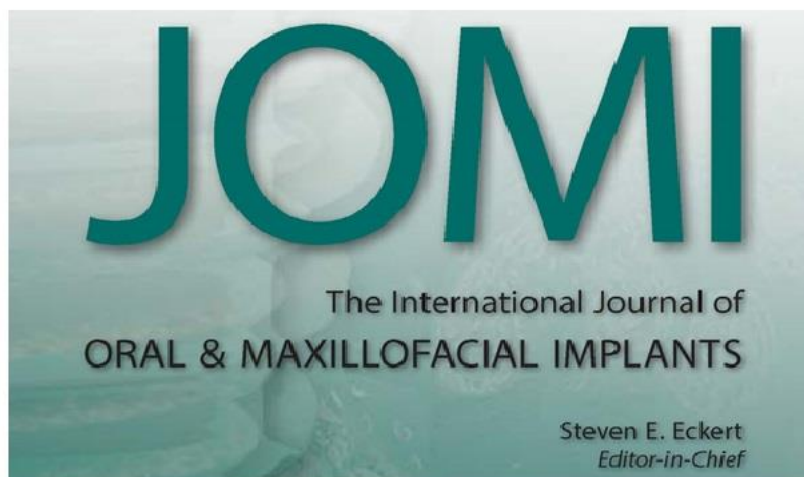
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 01, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 01, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – Paper submetido



Immediate implant installation in the maxilla of Wistar rats: description of the technique and definition of the analysis period by removal torque

de Souza Batista FR; Ervolino-Silva AC; Pitol-Palin L; Hassumi JS; Monteiro NG; Okamoto R

Fábio Roberto de Souza Batista, MSc. São Paulo State University, Araçatuba Dental School, Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5105-7686>. (fabiorsbatista@gmail.com)

Ana Cláudia Ervolino da Silva, MSc. São Paulo State University, Araçatuba Dental School, Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6592-0460>. (ana.ervolino@hotmail.com)

Letícia Pitol Palin, MSc. São Paulo State University, Araçatuba Dental School, Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4765-3765>. (leticiappalin@gmail.com)

Jaqueline Suemi Hassumi, MSc. São Paulo State University, Araçatuba Dental School, Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5214-1214>. (jaquelinehassumi@hotmail.com)

Naara Gabriela Monteiro, DDS. São Paulo State University, Araçatuba Dental School, Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2857-9195>. (naaragmonteiro@gmail.com)

Roberta Okamoto, PhD. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba Dental School, Department of Basic Science, Araçatuba, São Paulo, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6773-6966>. (roberta.okamoto@unesp.br)

Corresponding Author: Roberta Okamoto

*São Paulo State University (UNESP), Araçatuba Dental School
Department of Basic Science
Address: 1193 Jose Bonifácio St.
16015-050, Araçatuba, São Paulo, Brazil
e-mail: roberta.okamoto@unesp.com Tel: +55 (18) 3636-2787*

ANEXO C – Declaração de patente



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



DECLARAÇÃO DE COMUNICAÇÃO DE INVENÇÃO

Declaramos ter recebido dos inventores Roberta Okamoto, Paulo Noronha Lisboa Filho, Roberto Santana da Silva, Letícia Pitol Palin, Igor Lebedenco Kitagawa, Fábio Roberto de Souza Batista e Cristina Antoniali Silva, a Comunicação de Invenção intitulada "FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES COM MOLÉCULA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER BY LAYER COMO ESTRATÉGIA PARA A MELHORA DO PROCESSO DE REPARO PERIMPLANTAR EM RATAS", representada pelo código da Agência UNESP de Inovação 20CI134.

Pelo exposto, constata-se que a Comunicação de Invenção compreende as condições necessárias para compor o portfólio de invenções da Agência UNESP de Inovação e será submetida à avaliação das áreas de Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia.

São Paulo, 23 de abril de 2021.

RENAN PADRON
ALMEIDA:33778
301896

Assinado de forma digital
por RENAN PADRON
ALMEIDA:33778301896
Dados: 2021.04.23
11:44:11 -03'00'

Renan Padron Almeida
Agência UNESP de Inovação
Gerente de Propriedade Intelectual



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



RELATÓRIO DE EXAME DAS CONDIÇÕES DE PATENTEABILIDADE

Título da Comunicação de Invenção: Funcionalização da Superfície de Implantes com Molécula Doadora de Óxido Nítrico através da Técnica de Layer by Layer como Estratégia para a Melhora do Processo de Reparo Perimplantar em Rata

Código: 20CI134

Inventor(a) Responsável: Roberta Okamoto

Em resposta à submissão da Comunicação de Invenção supracitada à esta Agência apresentamos a presente manifestação ao corpo de inventores em razão do Exame preliminar das condições de patenteabilidade no que tange as exigências do território Brasileiro.

Na presente solicitação é descrito um (1) processo de tratamento de superfície de implante odontológico com adição de molécula vasodilatadora e doadora de óxido nítrico, (2) o produto obtido do processo, qual seja implantes odontológicos com a referida molécula e (3) uso do produto como implante odontológico com atividade de ósseointegração. Tendo isso, o exame procedeu à prospecção e análise dos critérios de patenteabilidade da presente invenção, iniciando-se pelos critérios de novidade e atividade inventiva. Em busca de anterioridades realizada, foram encontrados os documentos relacionados no quadro abaixo referentes ao estado da técnica do invento.

Documento	Data de publicação	Relevância*
D1. Ação sinérgica de risedronato sistêmico e Rutherpy local no reparo perimplantar de ratas ovariectomizadas e portadoras de síndrome metabólica: avaliação biomecânica e molecular. Extrato de processo de fomento.	01/09/2020	Y
D2. RU2712032C2 - Porous structure for bone	09/07/2015	Y

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



implants		
----------	--	--

A: documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância;
 N documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova quando o documento é considerado isoladamente;
 I: documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada dotada de atividade inventiva ou de ato inventivo quando o documento é considerado isoladamente;
 Y: documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada dotada de atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um.

O documento D1 compreende um extrato de processo de fomento junto à FAPESP que descreve o uso de doador de óxido nítrico para buscar melhorias no reparo ósseo. D2 compreende pedido de patente que descreve o uso da técnica de layer-by-layer para desenvolvimento de implantes. Entende-se que a combinação dos dois documentos antecipa aspectos essenciais do presente invento, uma vez que a técnica layer-by-layer já se provou eficiente para o desenvolvimento de superfícies de implantes, e a substância doadora de óxido nítrico é citada com potencial para reparo ósseo em implantes de mamíferos. No entanto, não há como afirmar que essa combinação seria óbvia para um técnico no assunto, motivo pelo qual entende-se que o critério de atividade inventiva não se encontra prejudicado. Sendo assim, quanto às análises dos Requisitos de Patenteabilidade conforme Arts. 8.º, 11.º, 13.º e 15.º da LPI – Novidade e Atividade Inventiva, entende-se que os critérios estão contemplados no presente invento. Entende-se também que a tecnologia pode ser utilizada ou produzida em um tipo de indústria, atendendo ao critério de aplicação industrial.

Assim, diante do exposto e por meio das reflexões apresentadas, bem como, por meio da conferência do cumprimento dos requisitos mínimos legais para se reivindicar, por força de lei, o direito de patente perante o território brasileiro recomenda-se o protocolo de pedido de patente de invenção.

Gerência de Propriedade Intelectual

Agência Unesp de Inovação

Agência UNESP de Inovação
 Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro
 CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil
 Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br