

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 03/08/2022.

PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA

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

Araçatuba – SP

2020

PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA

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

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

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

Coorientador: Prof. Associado Paulo Roberto
Botacin

Araçatuba – SP

2020

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

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

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

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

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

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

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

DEDICATÓRIA

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPES

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

FAPESP

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leonardo da Vinci

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/kg/dia - Micrograma por quilograma por dia

µm - Micrômetro

µm² - Micrômetro quadrado

Al - Alumínio

BV - Volume ósseo

BV/TV - Percentual de volume ósseo

Cu - Cobre

g - Grama

Kv - Quilovolt

Micro CT - Microtomografia Computadorizada

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mm³ - Milímetros cúbicos

N – Newton

N.cm - Newton por centímetro

nº – Número

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

Po-tot - Percentual de porosidade total

PTH - Paratormônio

Rpm - Rotações por minuto

Tb.N - Número de trabéculas

Tb.Sp - Separação entre as trabéculas

Tb.Th - Espessura trabecular

vs - versus

µA – Microampére

W - Watt

W/cm² - Watt por centímetro quadrado

kHz - Quilohertz

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

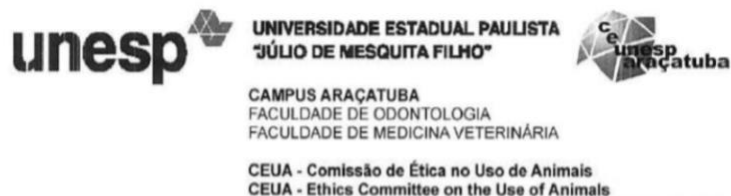
VANDERSCHUEREN, D. *et al.* Androgens and bone. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 389-425, Jun. 2004.

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

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

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito do PTH tópica, incrementado ao Biogran® nos defeitos ósseos em ratos submetidos à orquiectomia", Processo FOA nº 00199-2017, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 04 de Março de 2019.

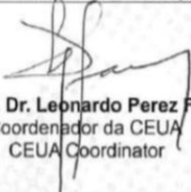
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Abril de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of topical PTH, increased to Biogran® on bone defects in orchietomized rats", Protocol FOA nº 00199-2017, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 04, 2019.

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


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

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