

NATÁLIA BARBOSA DE SIQUEIRA

**Efeito do BioGran® funcionalizado ao Raloxifeno através
do processamento ultrassônico no reparo ósseo em
defeitos críticos de calvárias de ratos**

Araçatuba – SP
2021

NATÁLIA BARBOSA DE SIQUEIRA

**Efeito do BioGran® funcionalizado ao Raloxifeno através
do processamento ultrassônico no reparo ósseo em
defeitos críticos de calvárias de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof. Ass. Eduardo Vieira Hochuli

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Pereira

Araçatuba – SP
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S618e Siqueira, Natália Barbosa de.
Efeito do BioGran® funcionalizado ao Raloxifeno
através da sonicação química no reparo ósseo em
defeitos críticos de calvarias de ratos / Natália Barbosa
de Siqueira. – Araçatuba, 2021
39 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Eduardo Vieira Hochuli
Coorientador: Prof. Rodrigo Pereira

1. Materiais biocompatíveis 2. Sonicação 3. Cloridrato de raloxifeno I. T.

Black D7
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Dedico essa conquista, em especial, à minha **família** que sempre estive presente, mesmo à distância, até que esse momento chegasse.

A **meu amado pai (Gilvandro André de Siqueira)** que me inspirou e plantou em mim desde pequena a importância dos “estudos”, que mesmo tendo indo embora tão cedo, se fez presente todos os dias da minha vida, se hoje eu chego até aqui, você, meu pai, é o responsável.

A **minha amada mãe (Rosenilda Barbosa de Siqueira)** por ter me ensinado o verdadeiro significado de “**força**”, por ser a base da nossa família, superando todos os obstáculos, sendo pai e mãe, quando meu pai não mais esteve presente fisicamente, por ter se privado de tantas coisas para garantir o meu futuro e ver meus sonhos concretizados

As minhas irmãs, **Nicole Barbosa de Siqueira** e **Núbia Babosa de Siqueira**, por entenderem a minha ausência física desde quando iniciei esse sonho já distante alguns quilômetros na graduação em odontologia, e essa distância só aumentou até aqui, obrigada por serem minhas confidentes quando as dificuldades se fizeram presentes, pela cumplicidade e companheirismo.

Juntos vocês são meus pilares, meus alicerces, minha força, aqueles que não me deixaram desistir. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pois traçou caminhos que me fizeram chegar até aqui sem que eu percebesse, me permitiu crescer, me guiou com força por esse caminho e colocou pessoas incríveis na minha jornada

Ao meu estimado orientador Prof. Ass. Eduardo Hochuli-Vieira, por ter me escolhido para orientar, depositando em mim confiança, por ter me permitido crescer livremente, por acreditar no projeto por nós desenvolvido. Muito obrigada por me dar a oportunidade em ter no senhor um exemplo, de cirurgião e pesquisador.

A querida Profa. Adj. Roberta Okamoto, que me acolheu de braços abertos, me guiou, me acalmou, me aconselhou, me fez ver todo o mundo de possibilidades diante da pesquisa, prezando sempre pela ética e perfeição, que me deu inúmeras oportunidades de por em prática o lado cirurgião pesquisador, me permitiu fazer parte do seu grupo e me orientou como se sua orientanda fosse. Se um dia eu conseguir ser algo perto da profissional que a senhora é professora, estarei no caminho certo. Meu obrigada por todos os momentos compartilhados até o desenvolvimento desse projeto e por todos os outros momentos que ainda viram. Serei eternamente grata, em especial pela sua amizade.

Ao Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho, por toda ajuda direta que o senhor me deu no desenvolvimento de projetos que envolveram a sonicação química, por nós ter permitido utilizar o “seu laboratório”, pela humildade com que me tratou e me ensinou tantas coisas sobre esse tema

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Francisley Ávila Campos, Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Leonardo Faverani, meu muito obrigado por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados durante as atividades de plantão no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, nas clínicas da graduação e da pós-graduação, por toda assistência e paciência em nós ensinar a arte de ser professor.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Rodrigo Pereira por toda presteza e disponibilidade em dividir conosco seu conhecimento, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelo apoio e confiança em mim depositado.

Aos meus colegas de pós-graduação por todos os momentos compartilhados desde as alegrias até as aflições por alguma coisa que não estava dando certo em seus projetos. Em especial **a Leticia Pitol, Ana Claudia Ervolino, Naara, e Kim Henderson** pela amizade nos momentos difíceis, pelas risadas de alegria e também de aflição, pelos desabafos compartilhados pelo crescimento e aprendizado que obtivemos juntas, por me ajudarem como podiam e como não podiam na execução desse trabalho e de tantas outras coisas dentro do laboratório que não faziam parte da minha rotina, sempre que eu precisei estiveram presentes. Contem comigo pra tudo, meninas, um dia quero olhar pra trás com alegria e vê-las todas em papéis de destaque em alguma universidade, tendo o orgulho de falar que nossa amizade começou na pós-graduação.

Ao meu amigo e irmão João Victor por tantos momentos compartilhados, por muitas vezes me segurar quando as aflições eram maiores, pelas risadas, por tua sua amizade, pelos seus conselhos, pela sua irmandade. A você meu amigo eu desejo o melhor do mundo sempre. Não tenho dúvidas do seu sucesso pelo caminho que você está traçando.

Aos alunos da graduação, por terem nos permitido ajudá-los enquanto aprendíamos, pela troca mútua de informações e aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela concessão da Bolsa de Mestrado.

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

Ao Laboratório multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, pela realização do escaneamento dos espécimes em microtomografia computadorizada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e a Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista na pessoa do Prof. Adj. André Luís Fraga Briso. pela oportunidade em poder realizar este curso de mestrado, pelo apoio quando as dificuldades em realizar este projeto surgiram.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada pela gentileza e paciência em nós ajudar.

"Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado, mas consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele. Esta é a diferença profunda entre o ser condicionado e o ser determinado"
Paulo Freire

Siqueira NB. Efeito do BioGran® funcionalizado ao Raloxifeno através do processamento ultrassônico no reparo ósseo em defeitos críticos de calvárias de ratos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2021.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar o processo de formação óssea, bem como a microarquitetura óssea promovido pela associação entre o BioGran® e diferentes concentrações de raloxifeno através do método da sonoquímica em defeitos críticos realizados em calvária de rato. Em um total de doze ratos machos, um defeito crítico de 5 mm de diâmetro foi feito e preenchido com BioGran® 100% (Bg), BioGran® 90% associado à Raloxifeno 10%, e BioGran® 80% associado à Raloxifeno 20%. Aos 14 e 24 dias pós-operatório, foram aplicados os fluorocromos calceína e alizarina, de modo respectivo. A eutanásia ocorreu aos 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico para enxertia dos biomateriais. Análise de microtomografia computadorizada (micro-CT) através dos parâmetros de superfície de intersecção (i.S), fração de volume ósseo (BV/TV) e densidade de conectividade (Conn.Dn) e por microscopia confocal a laser por meio da dinâmica óssea, superfície de mineralização ativa e a taxa de aposição mineral (MAR). Os dados foram analisados através de análise estatística utilizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e o pós teste de Turkey ($p < 0.05$). Para os parâmetros de micro-CT avaliados os menores valores foram encontrados no grupo BG+RL10% ($p < 0,05$), valores similares foram encontrados entre os grupos BG e BG+RL20%. A microscopia confocal evidenciou melhor mineralização óssea e maior taxa de aposição mineral (MAR) para o Grupo BG+RL20% ($p < 0,05\%$). **Conclusão:** A concentração de Raloxifeno a 20% combinado ao BioGran® pelo método da sonoquímica parece ter acelerado o reparo ósseo.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Sonicação, Cloridrato de raloxifeno.

Siqueira NB. Effect of BioGran® functionalized to Raloxifene through ultrasonic processing in bone repair in critical defects in rat calvaria [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2021.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the bone formation process, as well as the bone microarchitecture promoted by the association between BioGran® and different concentrations of raloxifene through the sonochemistry method in critical defects performed in rat calvaria. In a total of twelve male rats, a critical defect of 5 mm in diameter was made and filled with BioGran® 100% (Bg), BioGran® 90% associated with Raloxifene 10%, and BioGran® 80% associated with Raloxifene 20%. At 14 and 24 days postoperatively, the fluorochromes calcein and alizarin were applied, respectively. Euthanasia occurred 30 days after the surgical procedure for grafting biomaterials. Analysis of computed microtomography (microCT) through the parameters of intersection surface (iS), bone volume fraction (BV / TV) and connectivity density (Conn.Dn) and by confocal microscopy through bone dynamics, surface of active mineralization and the mineral apposition rate (MAR). Data were analyzed through statistical using the Shapiro-Wilk normality test and the Turkey post-test ($p < 0.05$). For the me microCT parameters evaluated, the lowest values were found in the BG + RL10% group ($p < 0.05$), similar values were found between the BG and BG + RL20% groups. Confocal microscopy showed better bone mineralization and higher mineral apposition rate (MAR) for the BG + RL20% Group ($p < 0.05\%$). Conclusion: The concentration of Raloxifene at 20% combined with BioGran® by the sonochemistry method seems to have accelerated bone repair.

Keywords: Biocompatible materials. Sonication. Raloxifene hydrochloride.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Processo de sonicação do BioGran® associado à Raloxifeno 10% (BG + RL10%)	19
FIGURA 2 - Processo de sonicação do do BioGran® associado à Raloxifeno 20% (BG + RL20%)	19
FIGURA 3 – Cirurgia para confecção do defeito crítico em calvária. A: Tricotomia; B: Incisão; C e D: Confecção do defeito crítico; E: deposição do biomaterial no defeito crítico; F: Sutura	20
FIGURA 4 - Delineamento do modelo experimental	21
FIGURA 5 – Figura 5 – Microscopia confocal. Calceína, alizarina e sobreposição Calceína/Alizarina para os grupos BG, BG+RL10% e BG+RL20%	26
FIGURA 6 – Dinâmica óssea (μm^2) dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%, pelas expressões de calceína e alizarina	27
FIGURA 7 – Superfície ativa de mineralização dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%	27
FIGURA 8 – Taxa de aposição mineral por dia (μm) dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%, avaliada linearmente	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Apresentação dos grupos de acordo com o material de enxertia	17
TABELA 2 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Superfície de intersecção (i.S), fração de volume ósseo (BV/TV), e densidade de conectividade (Conn.Dn)	24
TABELA 3 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Fração de volume ósseo (BV/TV). Diferença estatisticamente significativa: a-b ($p=0,0017$); b-c ($p=0,0087$)	24
TABELA 4 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Densidade de conectividade (Conn.Dn)	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
Conn.Dn	Densidade de conectividade
Cu	Cobre
g	Grama
i.S	Superfície de interseção
Kv	Quilovolt
MAR	Taxa de aposição mineral
Micro CT	Microtomografia Computadorizada
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetros cúbicos
N	Newton
n	Número
Rpm	Rotações por minuto
SERM	modulador seletivo do receptor de estrógeno
vs	versus
μA	Microampére
μg/kg/dia	Micrograma por quilograma por dia
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

As reabilitações orais através da terapia com implantes demandam que haja volume ósseo suficiente além da qualidade deste no rebordo remanescente.^{1,2} Dessa maneira, um aumento ósseo prévio pode ser requerido, sendo para tanto utilizadas inúmeras técnicas e substitutos ósseos.³

O enxerto ósseo de origem autógena é considerado o biomaterial mais apropriado quando há a necessidade de restauração da arquitetura óssea devido a preservação das células e proteínas osteogênicas.⁴⁻⁷

Todavia, a obtenção do enxerto ósseo autógeno pode trazer ao paciente morbidades, como lesões nervosas, além do aumento do tempo cirúrgico, uma vez que há a necessidade de um segundo sítio, aumento dos custos, dor e reabsorção imprevisível deste enxerto.^{8,9} O uso deste tipo de enxerto é condicionado a disponibilidade do tecido em termos de qualidade e quantidade óssea da área doadora⁵, assim, o paciente pode não possuir um sítio doador com a quantidade demandada pela área destinatária, ou, as condições médicas do paciente podem influenciar a qualidade óssea, o que pode tornar a utilização deste tipo de enxerto com menor aproveitamento.^{10,11}

Nesse contexto, uma grande variedade de biomateriais tem sido desenvolvida, como os xenoenxertos, os enxertos alógenos e os materiais aloplásticos.^{10,11}

O uso dos enxertos ou substitutos ósseos vai além das perdas ósseas provocadas por extrações dentais. Eles podem ser utilizados para tratamentos de defeitos provocados por tumores ósseos, trauma, pseudo-artrose e doenças destrutivas das articulações, inclusive em outras localizações que não a face.^{9,12,13}

Um dos biomateriais mais aplicados como substituto ósseo é o Bio-Oss®, um enxerto ósseo bovino desmineralizado,¹⁴ cuja utilização é amplamente consolidada, com resultados clínicos exitosos mencionados na literatura.¹⁵⁻¹⁸ Uma eficácia de cerca de 80-100% foi apontada quando este material era empregado, dessa forma, sugeriu-se uma eficácia semelhante ao osso autógeno, o que faz com que seja considerado como promissor em comparação aos demais de sua categoria.^{19,20} Entretanto, tal material apresenta custo elevado se comparado aos demais de sua categoria, exigindo que novas tecnologias e materiais sejam aprimoradas com o propósito de

induzir ao máximo o desenvolvimento de tecido ósseo através da angiogênese e osteogênese, com um custo reduzido.²¹⁻²³

Uma possibilidade que tem sido explorada recentemente, consiste na melhora das propriedades destes biomateriais, através da funcionalização de suas superfícies, com moléculas bioativas que atuam diretamente nas células do tecido ósseo, desencadeando respostas favoráveis ao processo de reparo tecidual.²³ Para tanto foi demonstrado a viabilidade da utilização do processo de sonicação através do ultrassom, na qual é possível promover a síntese de materiais nanoestruturados, homogeneizando duas ou mais substâncias, por meio de ondas ultra-sônicas, promovendo modificações químicas e físicas.²⁴⁻²⁸

O processamento ultrassônico, é considerado um método ecologicamente correto, econômico e simples, capaz de prover a elaboração de nanopartículas com características incomuns, em comparação com outros processos de síntese de matérias e/ou substâncias.²⁸

Resultados favoráveis têm atestado a efetividade da associação de um modulador seletivo de receptores de estrogênio, o Raloxifeno, a materiais de enxertia óssea com o objetivo de melhorar a neoformação óssea através da osteocondução,²⁹⁻³¹ utilizando a técnica da sonicação a ser utilizada no presente trabalho.^{23,31}

Sabe-se que o BioGran®, é uma cerâmica bioativa que apresenta propriedades osteocondutivas e boa biocompatibilidade, além disso sua reabsorção ocorre devido à dissolução química.³² Essa vitrocerâmica é formulada a partir de 45% de dióxido de silício (SiO₂), 24,5% de óxido de cálcio (CaO), 24,5% de óxido de sódio (NaO₂) e 6% de pentóxido de fósforo (P₂O₅).³³ Ainda, bons resultados com o seu uso tem sido reportado para fins de enxertia óssea.^{34,35}

Junto a estas propriedades, considera-se que a adição de moléculas bioativas, como o modulador seletivo de receptor de estrógeno, atuando diretamente em osteoblastos do leito receptor, pode desencadear melhores respostas biológicas, o que pode resultar numa melhora do tecido ósseo reparacional. Promovendo um efeito a nível celular, ainda maior, através da osteocondução.^{23,29}

Desde que os princípios de enxertia foram determinados, o uso desses biomateriais vem crescendo consideravelmente.³⁶⁻³⁸ Estima-se que cerca de 2,2

milhões de cirurgias com o uso de substitutos ósseos sejam feitos por ano no mundo, movimentando cerca de 2,5 bilhões de dólares.^{39,40} Ainda, prevê-se que este mercado venha a mobilizar cerca de 922,6 milhões em 2024.⁴¹ Dessa forma, constituindo um mercado atrativo do ponto de vista financeiro.

Assim, diante do exposto, torna-se interessante viabilizar e investigar a funcionalização de um biomaterial com características superiores aos disponíveis no mercado, com um custo reduzido, por meio da associação entre o Raloxifeno e o BioGran® utilizando a sonoquímica. Dessa forma contribuindo para o aprimoramento deste biomaterial. Ademais esta técnica tem sido apontada como capaz de promover síntese de substâncias, além de, melhoras significativas das características de biomateriais e medicamentos, assim, espera-se, da mesma forma, estudar mais a fundo a sua utilização.^{26,27,42}

2 OBJETIVOS

Analisar o processo de formação óssea, bem como, a microarquitetura óssea promovido pela associação entre o BioGran® e diferentes concentrações de raloxifeno através do método da sonoquímica em defeitos críticos realizados em calvária de rato, por meio de análise de microtomografia computadorizada e microscopia confocal a laser.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo experimental

Este estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, SP, Brasil, sob processo FOA 00235-2017, e realizado de acordo com as diretrizes ARRIVE para pesquisa em animais, propostas por Kilkenny.⁴³ Doze ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), pesando 300 a 400 g, na idade adulta, foram selecionados e divididos aleatoriamente em três grupos experimentais:

TABELA 1 - Apresentação dos grupos de acordo com o material de enxertia

IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO	N	MATERIAL DE ENXERTIA
BG	4 animais	BioGran® 100%
BG + RL10%	4 animais	BioGran® 90%.+ 10% Raloxifeno
BG + RL20%	4 animais	BioGran® 80% + 20% Raloxifeno

Fonte: Autor, 2021

Preparação do Biomaterial:

O protocolo empregado para a preparação e caracterização do Biomaterial foi o estabelecido por Gomes-Ferreira et al.,³⁰ realizado no Laboratório de Materiais Avançados do Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP-Bauru (Responsável: professor Paulo Noronha Lisboa-Filho).

Para preparação do biomaterial, o BioGran® associado à 10% (BG + RL10%) e 20% em massa de Raloxifeno (BG + RL20%), foi submetido a um processamento ultrassônico. De forma que, a cada 0,9 g de BioGran®, 0,1g de Raloxifeno na sua

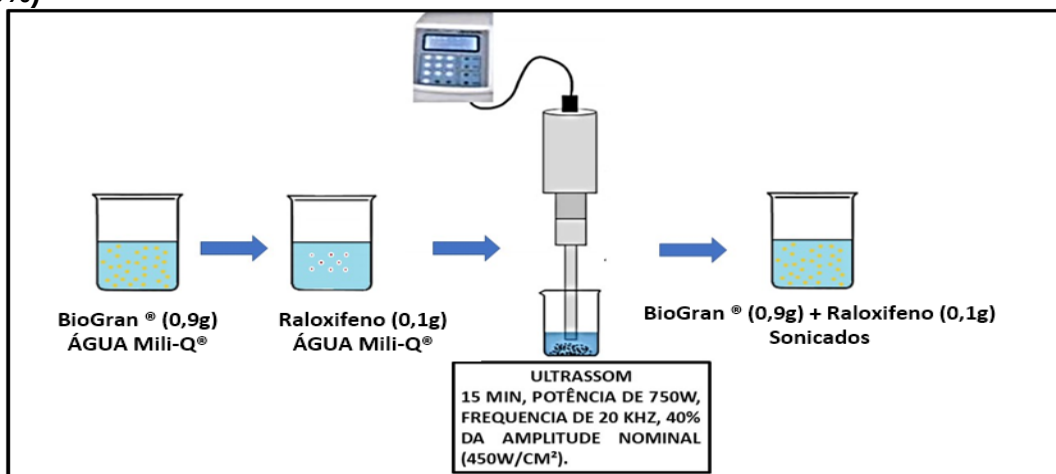
forma sólida foi utilizado (BG + RL10%) (Figura 1) ou a cada 0,8 g de BioGran®, 0,2g de Raloxifeno foi associado (BG + RL20%) (Figura 2). Assim, foi promovida a homogeneização ou incorporação do raloxifeno ao biomaterial BioGran®.

Essa síntese ultrassônica foi realizado através do aparelho Sonics® VCX-750 (Sonics & Materials, Inc., EUA), por cerca de 15 minutos.³⁰ Os parâmetros adotados foram: potência de 750 W; frequência de 20 kHz; e 40% da amplitude nominal do equipamento (450W / cm²). Foi utilizada como solvente para os solutos a água ultra-pura Milli-Q® (Millipore, EUA). A água Milli-Q® ultrapura faz com que as bolhas de cavitação tenham maior vapor de soluto e, assim, acelere o efeito da cavitação acústica.

De maneira que esta técnica consiste na conversão de voltagem elétrica em ondas sonoras, por meio de um aparelho ultrassom. Estas ondas sonoras causam vibrações mecânicas que são transferidas para o meio líquido formando bolhas/microbolhas, que entram em colapso, processo este denominado de cavitação acústica.⁴⁴ Durante este processo foi utilizado um ultrassom de ponteira que oscila a uma frequência fixa e potencial variável. A oscilação rápida desta ponteira produz um campo de alta energia no fluído. No solvente dentro desse campo acontece um processo de ebulição e colapso de bolhas.⁴⁵ As vibrações dessa ponteira, em associação ao colapso das bolhas, são capazes de provocar a incorporação de substâncias biotivas a materiais, e a redução das partículas a escala manométrica. Quando o ultrassom é aplicado a um sistema sólido-líquido, devido à proximidade da superfície sólida, o colapso entre as bolhas ocorre de forma assimétrica, há uma entrada de fluido da bolha para a superfície sólida, a este fenômeno dá-se o nome de microstreaming (microjatos), ou seja, há uma penetração das bolhas formadas na matriz sólida.⁴⁶

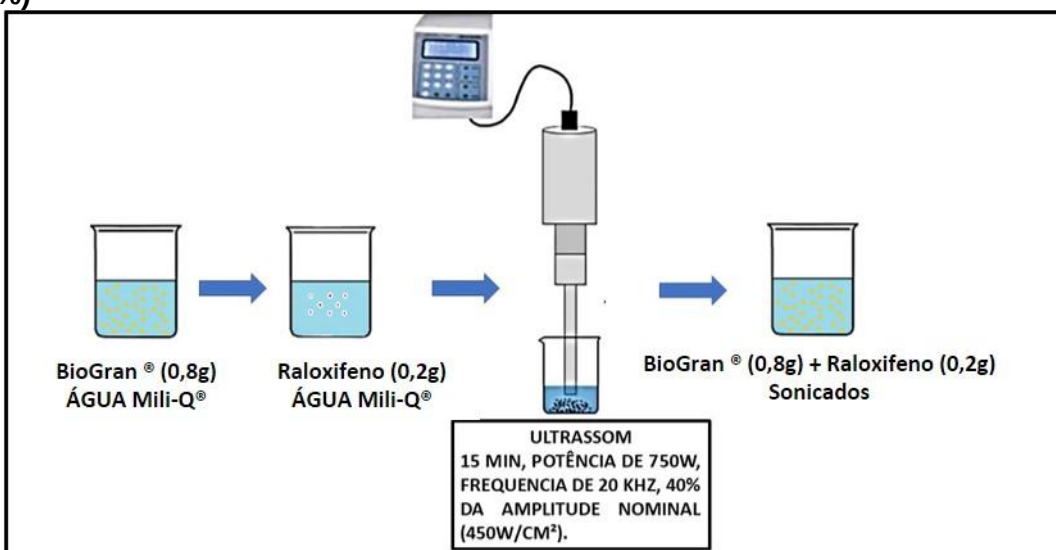
Uma vez realizado este processamento, as amostras foram deixadas para secar a 60 °C por um período de 8 horas. O processo de esterilização do biomaterial foi efetivado por meio de exposição ultravioleta (UV).

FIGURA 1 - Processo de sonicação do BioGran® associado à Raloxifeno 10% (BG + RL10%)



Fonte: Autor, 2021

Figura 2 - Processo de sonicação do BioGran® associado à Raloxifeno 20% (BG + RI20%)



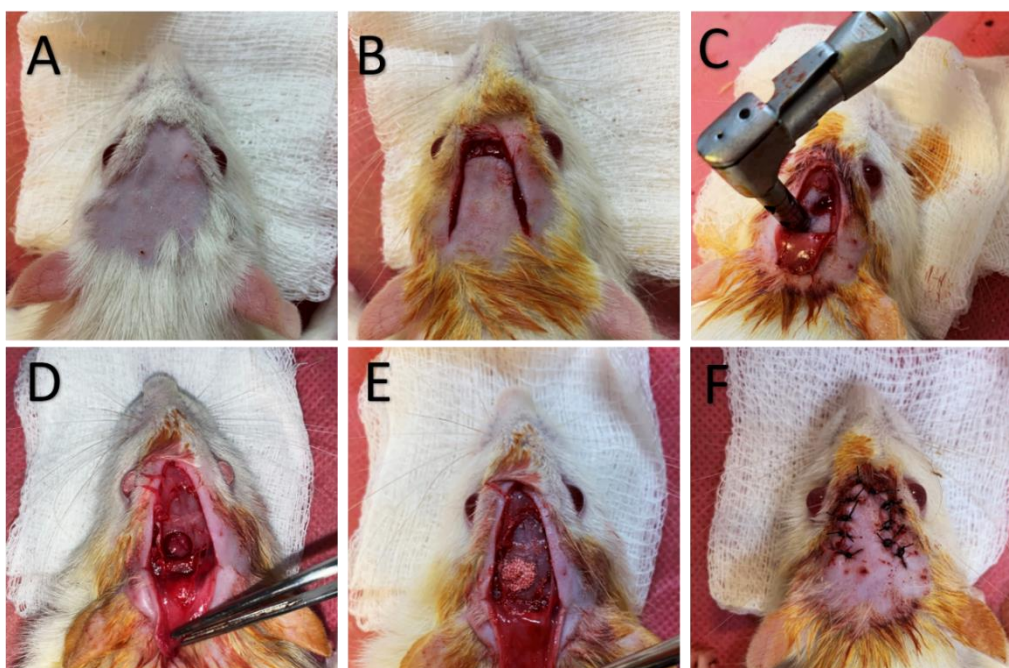
Fonte: Autor, 2021

Procedimento cirúrgico

Para execução do procedimento cirúrgico, após jejum de oito horas, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Dopaser®, Laboratório do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 6 mg / kg e cetamina (Vetaset®, Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, Brasil) a 70 mg / kg. O preparo do sítio cirúrgico foi realizado na região fronto-parietal da calvária com, e antissepsia com iodo povidona 10% (PVPI

10%, com iodo ativo 1%; Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). Os animais foram colocados em decúbito ventral e campos estéreis foram posicionados. Para acessar a calvária, uma incisão em forma de U com aproximadamente 2cm foi efetuada com uma lâmina de bisturi 15C (Feather Industries Ltd., Tóquio, Japão) acoplada a um cabo de bisturi (Hu-Friedy®, Frankfurt, Alemanha). O retalho de espessura total foi destacado cuidadosamente com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) para fornecer exposição óssea. Assim defeitos ósseos foram performados na região parietal sob irrigação salina estéril com uma trefina 5 mm (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA. Os defeitos foram preenchidos conforme os grupos experimentais, cobertos com membrana de osso bovino reabsorvível (Baumer®, GenDerm; Brazil), e em seguida a síntese do retalho foi efetuada através de uma sutura interrompida simples com fio de Nylon 5-0 (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon (Figura 3). Após o procedimento, os animais receberam uma dose intramuscular de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Pentabiótica, Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health Ltd., Campinas, Brasil) por injeção intramuscular.

Figura 3 – Cirurgia para confecção do defeito crítico em calvária. A: Tricotomia; B: Incisão; C e D: Confecção do defeito Crítico; E: deposição do biomaterial no defeito crítico; F: Sutura.



Fonte: Autor, 2021

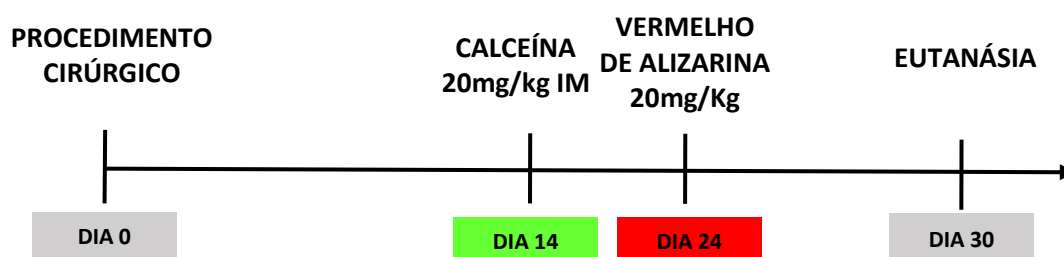
Infiltração pós-operatória dos fluorocromos

Aos 14 dias do procedimento cirúrgico foi administrado por via intramuscular 20mg/kg do fluorocromo calceína e aos 24 dias 20mg/kg do fluorocromo vermelho de alizarina, para a realização da microscopia confocal a laser.

Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes

A eutanásia dos animais aconteceu 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico, através de uma sobredosagem de anestésicos, Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), 10mg/Kg, e Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Constatada a morte dos animais, toda a região da calvária contendo os materiais enxertados foram removidas.

FIGURA 4 - Delineamento do modelo experimental



Fonte: Autor, 2021

Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Após a eutanásia dos espécimes, as amostras foram armazenadas em solução de formalina a 10% (pH=7,0) lavadas em água corrente por 24 horas e acondicionadas em álcool a 70%. Os espécimes foram escaneados em um microtomógrafo (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), cortes de 11 µm de espessura (90Kv e 111µA), filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0,6 mm, resolução de 2016 × 1344, e um tempo de aquisição de 50 minutos. Após, as imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (v1.6.9.8) (SkyScan – Kontich, Belgium)

com um alisamento de 2, uma correção de artefato em anel de 5, correção de endurecimento do feixe de 20%, e uma variação de correção de imagem de 0,007 a 0,061. Através do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas nos planos transversal, longitudinal e sagital. As análises do defeito crítico, em 40 slices, foram avaliadas no software CTAnalyzer (CTAn) (v1.12.4.0) (SkyScan – Kontich, Belgium). Com isso, foram definidos a fração de volume ósseo (BV/TV), a superfície de intersecção (i.S), e a densidade de conectividade (Conn.Dn) conforme preconizado por Buxsein *et al.*⁴⁷ Foi realizada uma reconstrução em 3D através do software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

Microscopia confocal a laser

Para está análise foi administrado nos animais do estudo calceína e vermelho alizarina conforme descrito anteriormente no delineamento do estudo experimental. Após passarem por um processo de desidratação por uma sequência crescente de álcoois, as peças foram infiltradas em solução de acetona e metilmetacrilato MMAL (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brazil) na proporção 1:1. Seguido de banhos de metilmetacrilato. Peróxido de benzoíla (1%, Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover, Germany) foi adicionado ao último banho. As amostras foram inseridas em tubos de vidro e mantidos em uma temperatura de 37°C por 5 dias até a polimerização da resina. Após a remoção dos tubos, foi realizado o desgaste das amostras com broca “Maxcut” montada em motor elétrico (Strong 210, São Paulo, SP, Brazil), paralelo ao plano axial das calvárias. As amostras foram, então, submetidas a um progressivo desgaste manual em politrax (ECOMET 250PRO/AUTOMET 250, Buchler, Lake Bluff, Illinois) com papéis de lixa (Granulações de 120, 300, 400, 600, 800 e 1200; Carbimet 2, Buchler, Lake Blunff, Illinois) sob luz fluorescente, até uma espessura de 80 µm, conferida através de um paquímetro digital (Mitutoyo, Pompeia, SP, Brazil). Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas, imersos em óleo mineral (Petrolato líquido, Maantecor, Taquara, RJ, Brazil) e fixadas com esmalte para prevenir o extravasamento do óleo.

O escaneamento longitudinal de cada calvária foi realizado com o microscópio Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), usando objetiva 10x (aumento original de 100x), no Centro de Microscopia Eletrônica do

Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Obteve-se, então, imagens dos fluorocromos calceína (coloração verde) e da alizarina (coloração vermelha), separadamente, houve a reconstrução dessas imagens, através da qual foi possível realizar uma sobreposição das imagens dos fluorocromos, para a avaliação da dinâmica óssea, da superfície de mineralização ativa, e do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).²⁹

Através do software Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá) foi possível mensurar as áreas correspondentes à precipitação de calceína e de alizarina, com o auxílio da ferramenta “color threshold”, a área foi selecionada e mensurada através da ferramenta “measure”.

Para a análise da aposição óssea mineral, com a ferramenta “straight”, 3 medidas compreendendo a margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina foram obtidas, sendo a média deste valor, dividido por 10 (compreende o intervalo de tempo transcorrido entre a aplicação da calceína e da alizarina).⁴⁸

Análise estatística

Os dados obtidos através da microtomografia e de microscopia confocal foram submetidos à análise estatística através do software GraphPad Prism 7.03 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Foi realizado a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, para a distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Os parâmetros de micro-CT de porcentagem de volume ósseo (BV/TV), superfície de interseção (i.S), e densidade de conectividade (Conn.Dn), e de microscopia confocal de avaliação da dinâmica óssea, superfície de mineralização ativa, e taxa de aposição mineral (MAR), obedeceram ao teste de normalidade, foi, então, utilizado o teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Quanto aos dados obtidos do micro-CT, quantitativamente, referente à medida da superfície de intersecção (i.S) foi observado no Grupo BG o valor médio de 28,5 mm², no grupo BG+RL10% foi 15,22 mm², e BG+RL20% 24,25 mm², em que a medida de superfície se apresentou semelhante ao grupo BG, entretanto havia diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos BG e BG+RL10% ($p < 0,05$) (Tabela 2). Quando avaliado a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), o grupo BG+RL10% (21,56%) se mostrou inferior ao grupo BG+RL20% (41,39%) e BG (48,88%), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos BG e BG+RL10%, e entre BG+RL10% e BG+RL20% ($p < 0,05$) (Tabela 3). Com relação a densidade de conectividade (Conn.Dn) o maior valor médio foi encontrado no grupo BG+RL20% (276,81/mm³), quando comparado aos grupos BG (269,2 1/mm³) e BG+RL10% (171,3 1/mm³), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 4).

TABELA 2 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Superfície de intersecção (i.S), Diferença estatisticamente significativa: a-b ($p=0,0119$)

	VALOR MÉDIO	SD
BG	28,5 ^{a-b}	±6,169
BG+RL10%	15,22 ^{a-b}	±2
BG+RL20%	24,45	±0,8251

Fonte: Autor, 2021

TABELA 3 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Porcentagem de volume ósseo (BV/TV). Diferença estatisticamente significativa: a-b ($p=0,0017$); b-c ($p=0,0087$).

	VALOR MÉDIO	SD
BG	48,86 ^{a-b}	±82,27
BG+RL10%	21,56 ^{a-b. b-c}	±2,108
BG+RL20%	41,39 ^{b-c}	±58,93

Fonte: Autor, 2021

TABELA 4 – Resultados de Micro-CT para os grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%. Densidade de conectividade (Conn.Dn).

	VALOR MÉDIO	SD
BG	269,2	±8,607
BG+RL10%	171,3	±2,438
BG+RL20%	276,8	±1,76

Fonte: Autor, 2021

Microscopia confocal a laser

A representação do turnover ósseo na área enxertada com o biomaterial nos defeitos críticos pode ser vista na figura 5. Através da aplicação dos fluorocromos aqui utilizados, linhas de fluorescência são determinadas pela precipitação orgânica de cálcio na matriz óssea, tanto pela calceína (administrada aos 14 dias, com coloração esverdeada), quanto pela alizarina (administrada aos 24 dias). Assim o osso formado após a administração dos fluorocromos apresentará, linhas fluorescentes verdes, que evidenciam a expressão do osso antigo, enquanto as linhas vermelhas marcam o osso novo.

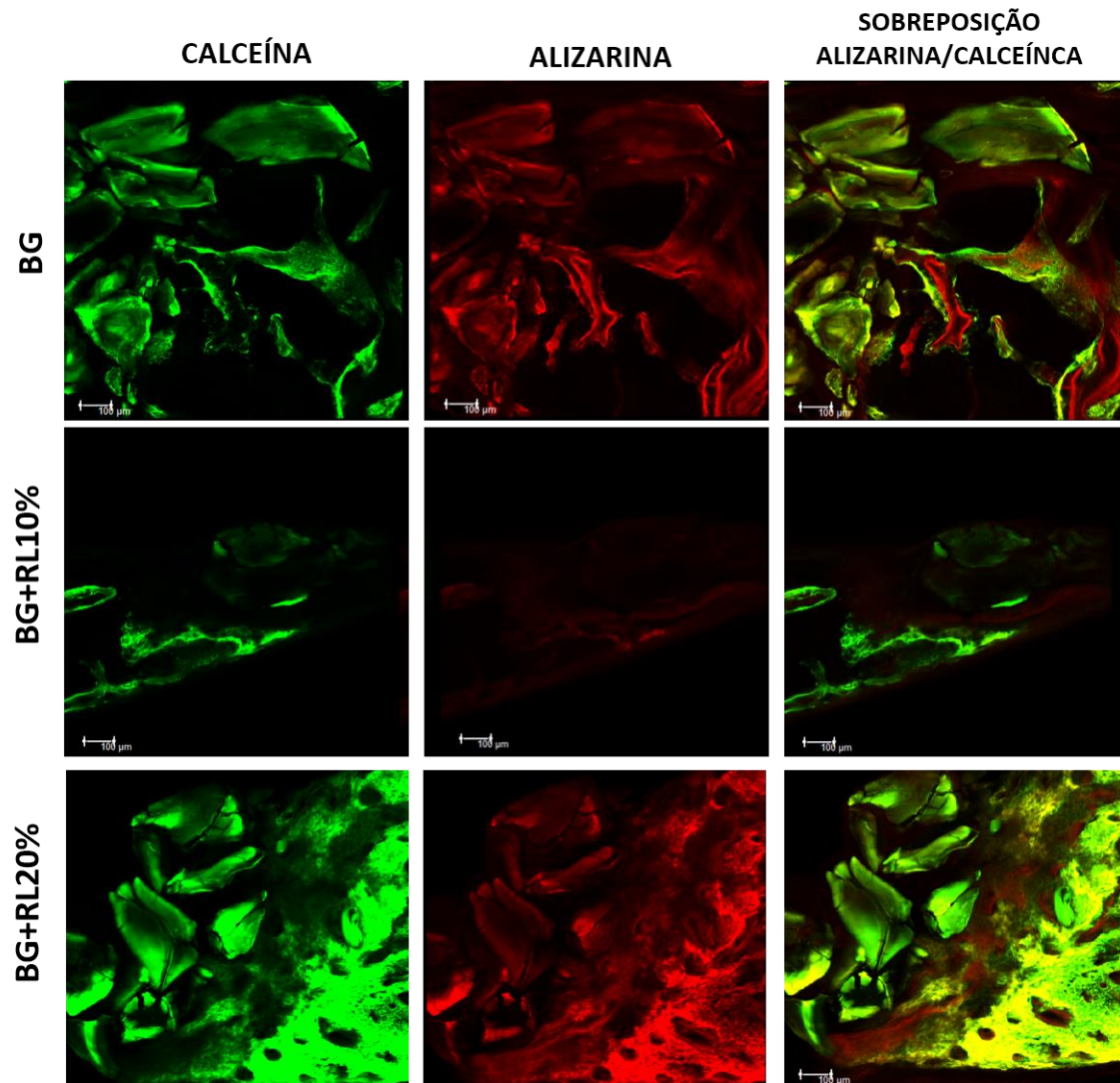
Quanto a dinâmica óssea representada pelos fluorocromos foi possível notar que o grupo BC+RL20% apresentou a maior precipitação de calceína entre todos os grupos e quando comparado a precipitação de alizarina, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa. Em contrapartida, houve uma tendência de menor precipitação de alizarina e maior para calceína no grupo BG+RL10%. **(Figura 6)**

Com relação a superfície de mineralização ativa o grupo BG+RL10% apresentou o menor valor médio quando comparado ao grupo BG e BG+RL20% que apresentaram valores similares, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa. **(Figura 7)**

Em relação a taxa de aposição mineral (MAR) por dia de avaliação do reparo ósseo, quando comparamos os grupos BG+RL10% e BG+RL20%, os maiores valores

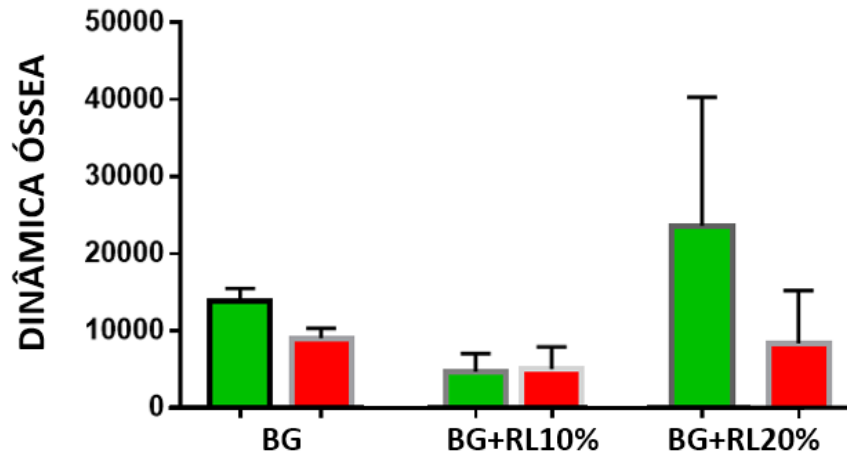
foram encontrados no grupo BG+RL20% com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). (Figura 8)

FIGURA 5 – Microscopia confocal. Calceína, alizarina e sobreposição Calceína/Alizarina para os grupos BG, BG+RL10% e BG+RL20%



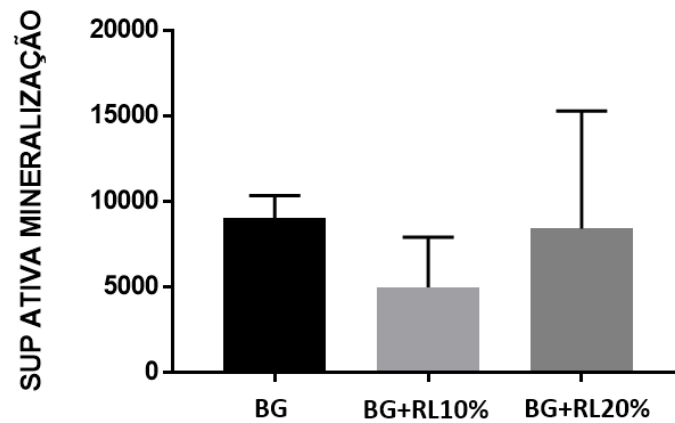
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 6 – Dinâmica óssea (μm^2) dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%, pelas expressões de calceína e alizarina.



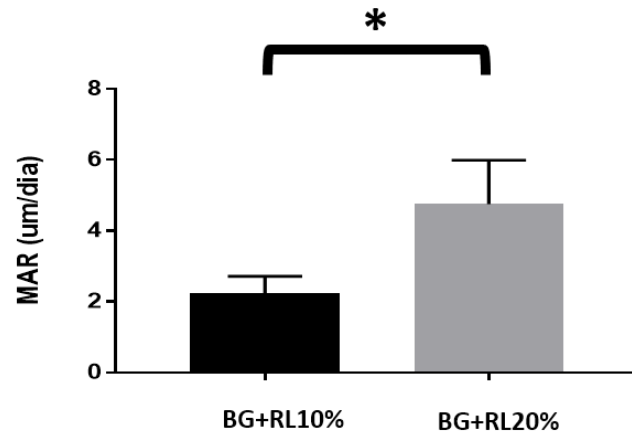
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 7 – Superfície ativa de mineralização dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 8 – Taxa de aposição mineral por dia (μm) dos grupos BG, BG+RL10%, BG+RL20%, avaliada linearmente. “*” indica uma diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$.



Fonte: Autor, 2021

5 DISCUSSÃO

Considera-se na atualidade que o caminho para as pesquisas em biomateriais utilizados como enxertos ósseos seja a funcionalização desses biomateriais, através da adição de moléculas ativas.

Diversos estudos tem demonstrado a eficácia do Raloxifeno, não só, na prevenção da osteoporose,⁴⁹⁻⁵¹ mas similarmente de maneira local, melhorando o reparo ósseo.^{23,29-31} Trata-se de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM), de segunda geração. Compõem um conjunto de moléculas não hormonais que se conectam à receptores de estrógeno, atuando como agonista ou antagonista do estrógeno em determinados tecido-alvo.⁵² De modo que no tecido ósseo é encontrado em osteoblastos, e desempenha papel na inibição da atividade osteoclástica.^{51,53}

Para avaliarmos de forma eficaz a morfologia e a microarquitetura óssea, o micro-CT é considerado uma análise essencial em animais de pequeno porte. São adquiridos dados capazes de permitir a reconstrução em 3D do espécime.⁴⁷ Parâmetros como densidade de conectividade (Conn.Dn) e fração de volume ósseo (BV/TV) são importantes na determinação dos resultados da microarquitetura do osso trabecular.⁴⁷ Valores aproximados destes parâmetros foram encontrados entre os grupos BG e BG+RL20%, com o maior valor de densidade de conectividade para o grupo BG+RL20%, embora não haja diferença estatisticamente significativa neste resultado, evidenciando, assim, uma melhor qualidade óssea da microarquitetura desses enxertos. Os menores valores para os parâmetros de micro-CT avaliados foram encontrados no Grupo BG+RL10%, resultados inferiores ao grupo controle onde o BioGran® foi enxertado sem a associação ao raloxifeno, demonstrando que esta concentração de raloxifeno não é suficiente para promover uma resposta a nível local no tecido ósseo.

Para compreender o processo de consolidação dos enxertos quando os biomateriais são utilizados, foi utilizado a administração de fluorocromos a fim de determinar a formação óssea. Ocorre que a calceína e o vermelho de alizarina possuem a capacidade de se unir diretamente ao cálcio na fase em que ele precipita na matriz óssea, assim por causa dessa correlação é possível inferir a quantidade de osso formado, de tecido mineralizado, através da quantidade de fluorescência.^{54, 55}

De forma que, o grupo cujo defeito continha apenas BioGran® apresentou uma equivalência entre os fluorocromos calceína e vermelho de alizarina, ou seja, quantidades equivalentes de osso antigo formado, aos 14 dias, e de osso, novo, formado aos 24 dias. Quando observamos o grupo em que o BioGran® foi associado a uma concentração de 10% em massa de Raloxifeno, há uma baixa concentração nos níveis de ambos os fluorocromos, evidenciando que esta concentração de fármaco não foi eficaz em melhorar a mineralização óssea e por consequência a formação óssea, corroborando os resultados encontrados pela análise de micro-Ct. Em contrapartida, quando a concentração de Raloxifeno era de 20% houve uma maior expressão de calceína quando comparado aos demais grupos. Ocorre que a quantidade de princípio ativo da droga dentro do biomaterial presente no defeito ósseo foi suficiente para permitir uma ação local deste fármaco, o que resultou no aumento da precipitação de cálcio, no período inicial (14 dias), evidenciado pela maior precipitação de calceína, o que pode demonstrar que o tecido ósseo formado no defeito foi mineralizado já no período de 14 dias, ou seja, mineralizou mais cedo que nos demais grupos, de mesma maneira, a atuação do fármaco a nível local pode ter contribuído para uma diminuição da reabsorção do osso formado neste período, o que também teria contribuído para esta maior formação neste período. Quando analisamos a taxa de aposição mineral (MAR) por dia de avaliação do reparo ósseo, o grupo BG+RL20% alcançou os maiores valores, com diferença estatisticamente significativa, confirmando o que foi dito previamente.

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa utilizando o BioGran® e as concentrações de 10% e 20% em massa de raloxifeno em defeitos críticos de calvárias de ratos, foi realizada uma análise da microarquitetura óssea utilizando apenas a análise de micro-CT. Outros parâmetros foram considerados para esta análise e os melhores resultados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foram encontrados para o grupo onde o BioGran® em 100% de massa estava presente e para o grupo em que a concentração de Raloxifeno foi de 20% em massa²³, corroborando os achados encontrados pelas análises de micro-CT e microscopia confocal realizadas nesta etapa do nosso estudo.

6 CONCLUSÃO

A concentração de 20% em massa de Raloxifeno parece ter contribuído para aceleração do reparo ósseo, dada a precipitação dos minerais, em um período mais inicial da formação óssea, o que pode ter levado este tecido a uma maturação óssea mais cedo do que os demais grupos. Em contrapartida, quando a concentração era de 10% em massa de Raloxifeno, parece ter havido um retardo no processo de reparo ósseo, com resultados inferiores ao grupo em que o BioGran® não foi associado ao Raloxifeno.

Outras análises devem ser realizadas para melhor caracterizar o tecido ósseo formado decorrente do enxerto BioGran® associado ao Raloxifeno em nível celular. Períodos mais longos de avaliação também podem permitir uma melhor caracterização do processo de reparo, dando o enfoque para as respostas de remodelação óssea.

REFERÊNCIAS

1. MATTIA, P. *et al.* Alveolar ridge dimensions in mandibular posterior regions: a retrospective comparative study of dentate and edentulous sites using computerized tomography data. **Surg. Radiol. Anat.**, v. 40, n. 12, p. 1419-1428, 2018.
2. RICKERT, D. *et al.* Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 41, n. 2, p. 160-167, 2012.
3. SANZ-SÁNCHEZ, I. *et al.* Effectiveness of lateral bone augmentation on the alveolar crest dimension: a systematic review and meta-analysis. **J. Dent. Res.**, v. 94, n. 9, p. 128-142, 2015.
4. MIRON, R. J. *et al.* Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 15, p. 481–489, 2013.
5. WATABANABE, K. *et al.* Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2013.
6. TONG, D.C. *et al.* A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 13, p. 175–182, 1998.
7. LEKHOLM, U. *et al.* Patient selection and preparation. *In*: BRANEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. (Ed.). **Tissue-integrated prostheses**. Chicago: Quintessence Publishing Co, 1986. p. 199–209.
8. RAGHOEBA, G. M. *et al.* Morbidity of mandibular bone harvesting: A comparative study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 22, p. 359–365, 2007.

9. DEVELIOGLU, H. *et al.* The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. **Dent. Mater. J.**, v. 28, n. 4, p. 396-400, 2009.
10. CORNING, P. J. *et al.* Ridge preservation following tooth extraction using mineralized freeze-dried bone allograft compared to mineralized solvent-dehydrated bone allograft: a randomized controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, v. 90, n. 2, p. 126-133, 2019.
11. LI, P. *et al.* Autogenous DDM versus Bio-Oss granules in GBR for immediate implantation in periodontal postextraction sites: A prospective clinical study. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 20, p. 923– 928, 2018.
12. TAKAHATA, M. *et al.* The effect of anti-resorptive therapies on bone graft healing in an ovariectomized rat spinal arthrodesis model. **Bone.**, v. 43, n. 6, p. 1057-66, 2008.
13. FUJISAWA, K. *et al.* Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution-precipitation reaction and Bio-Oss. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 29, n. 8, p. 121, 2018.
14. DE MOLON, R. S. *et al.* A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: histological and immunohistochemical analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 48, n.6, p. 810-823, 2019.
15. NART, J. *et al.* Radiographic and histological evaluation of deproteinized bovine bone mineral vs. deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen in ridge preservation. A randomized controlled clinical trial. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 28, p. 840–848, 2017.
16. VALENTINI, P. *et al.* Maxillary sinus grafting with anorganicbovine bone: a clinical report of long-term results. **Int. J. OralMaxillofac. Implants**, v. 18, p. 556-560, 2003.

17. SKOGLUNG, A. *et al.* A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 12, p. 194-199, 1997.
18. BERGLUNDH, T. *et al.* Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 8, p. 117-120, 1997.
19. CARDOSO, C. L. *et al.* Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. **Rev. Clin. Periodontol. Implantol. Rehabil. Oral**, v. 9, n. 2, p. 102-107, 2016.
20. ESPOSITO, M. *et al.* Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 7, p. CD003607, 2008.
21. SHAMSODDIN, E. *et al.* Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: a systematic review. **J. Adv. Pharm. Technol. Res.**, v. 10, n. 2, p. 46-50, 2019.
22. SOHN, D. S. *et al.* Histomorphometric study of rabbit's maxillary sinus augmentation with various graft materials. **Anat. Cell. Biol.**, v. 51, n. 1, p. S1-S12, 2018.
23. LISBOA-FILHO, P. N. *et al.* Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. **Connect Tissue Res.**, v. 59, n. 1, p. 97-101, 2019.
24. BANG, J. H. *et al.* Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. **Adv. Mater.**, v. 22, n. 10, p. 1039-1059, 2010.
25. ARRUDA, L. B. *et al.* Morphological modifications and surface amorphization in ZnO sonochemically treated nanoparticles. **Ultrason. Sonochem.**, v. 20, n. 3, p. 799-804, 2013.

26. MASON, T. J. *et al.* New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound, **Ultrason. Sonochem.**, v. 18, p. 226–230, 2011.
27. ROUMIANI, M. E. *et al.* Sonochemical synthesis of a nanodandelion tin(IV) complex with carbacylamidophosphate ligand as anti-Alzheimer agent: Molecular docking study. **Ultrason. Sonochem.**, v. 55, p. 207-216, 2019.
28. KARIZI, F. Z. *et al.* Ultrasound-assisted synthesis of nano-structured 3D zinc(II) metal-organic polymer: precursor for the fabrication of ZnO nano-structure. **Ultrason. Sonochem.**, v. 23, p. 238-245, 2015.
29. RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clin. Oral Investig.**, v. 21, n. 5, p. 1485–1494, 2017.
30. GOMES-FERREIRA, P. *et al.* Sonochemical time standardization for bioactive materials used in perimplantar defects filling. **Ultrason. Sonochem.**, v. 56, p. 437-446, 2019.
31. YOGUI, F. C. *et al.* A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 26, p. e20170329, 2018.
32. FURUSAWA, T. *et al.* Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. **Implant Dent.**, v. 6, n. 2, p. 93-101, 1997.
33. CORDIOLI, G. *et al.* Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 12, n. 3, p. 270–278, 2001.
34. PEREIRA, R. D. *et al.* Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran (TM) 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, 2017.

35. TADJOEDIN, E. S. *et al.* High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation - Histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 13, n. 4, p. 428-436, 2002.
36. GRIFFIN, K. S. *et al.* Evolution of bone grafting: bone grafts and tissue engineering strategies for vascularized bone regeneration. **Clin. Rev. Bone Min. Metab.**, v. 13, p. 232–244, 2015.
37. NIKOGHOSYAN, A. S. *et al.* Optical properties of human jawbone and human bone substitute Cerabone® in the terahertz range. **J. Contemp. Physics**, v. 51, n. 3, p. 256–264, 2016.
38. PUISYS, A. *et al.* Bone augmentation and simultaneous soft tissue thickening with collagen tissue matrix derivate membrane in an aesthetic area: a case report. **Stomatologija**, v. 19, n. 2, p. 64-68, 2017.
39. DANTAS, T. S. *et al.* Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 2, p. 131-5, 2011
40. KOLK, A. *et al.* Current trends and future perspectives of bone substitute materials: from space holders to innovative biomaterials. **J. Cranio-Maxillofac. Surg.**, v. 40, p. 706–718, 2012.
41. TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Dental membrane and bone graft substitutes market**. Albany: Transparency Market Research, 2016.
42. URENÃ, Y. R. C. *et al.* In situ sonochemical synthesis of ZnO particles embedded in a thermoplastic matrix for biomedical applications. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 49, p. 58-65, 2015.

43. KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol.**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.
44. PARVEEN, S. *et al.* A review on nanomaterial dispersion, microstructure and mechanical properties of carbon nanotube and nanofiber reinforced cementitious composites. **J. Nanomater.**, v. 2013, p.19, 2013.
45. HILDING, J. *et al.* Dispersion of carbon nanotubes in liquids. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v. 24, n. 1, p. 1-41, 2003.
46. BHASKARACHARYA, R. K., *et al.* Selected applications of ultrasonics in food processing. **Food Eng. Rev.**, v.1, p. 31-49, 2009.
47. BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
48. 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, 2013.
49. KAYATH, M. J. Raloxifeno e osteoporose: revisão de um novo modular seletivo do receptor de estrógeno. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v. 43, n. 6, p. 433-441, 1999.
50. DELMAS, P. D. *et al.* Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 23, p. 1641-1647, 1997.
51. YANG, N. N. *et al.* Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. **Science**, v. 273, p. 1222-1226, 1996.
52. RAMALHO, A. C. R. *et al.* Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? mecanismo de ação do estrógeno e de um

modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 44, n. 6, p. 471-482, 2000.

53. AMADEL, S. U. *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Labor.**, v.42, p. 5-12, 2006.
54. WANG, N. *et al.* Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from in vivo models. **J. Bone Miner. Res.**, v. 29, n.12, p. 2688–2696, 2014.
55. HASSELER, N. *et al.* Sclerostin deficiency is linked to altered bone composition. **J. Bone Miner. Res.**, v. 29, n.10, p. 2144–2151 2014.

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 **"Reparo ósseo com raloxifeno e composto não cerâmico de vidro bioativo"**, Processo FOA nº 00235-2017, 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 17 de Maio de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 17 de Agosto de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 17 de Setembro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Bone repair with raloxifene and bioglass nonoceramic composite"**, Protocol FOA nº 00235-2017, 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 May 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 17, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 17, 2018.

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