



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Jaqueline Suemi Hassumi

**Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico
e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas
com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica**

Araçatuba - SP
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Jaqueline Suemi Hassumi

**Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico
e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas
com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
– UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia

Orientadora: Roberta Okamoto

Araçatuba - SP
2021

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

H355a	Hassumi, Jaqueline Suemi. Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica / Jaqueline Suemi Hassumi. - Araçatuba, 2021 66 f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Roberta Okamoto 1. Osteoporose 2. Síndrome metabólica 3. Ácido Risedrônico 4. Genisteína 5. Implantes dentários 6. Osseointegração I. T. Black 762 CDD 617.63
-------	--

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Dedicatória

Dedico a todos que estão nos
agradecimentos, pois se eu cheguei
aqui, foi porque todos me ajudaram.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Meu Senhor e meu Deus, muito obrigada pelas felicidades e dificuldades até aqui, agradeço por aquelas que estão por vir. Senhor, sempre meu pilar espiritual e mental, basta ficar em silêncio que nós encontramos as respostas certas. Quero que tudo aconteça no seu tempo. No tempo de Deus, tudo ocorre na mais perfeita graça e harmonia, temos que ser pacientes, o tempo "DELE" nunca é o tempo errado.

Aos meus amados pais...

Mítian Hassumí (Seu Zé) e Suely Hassumí (Dona Rosa) antes de tudo quero falar que eu os amo muito. Sou grata por tudo e por todas as coisas que vocês fizeram por nós, sei que deixaram de lado muitas vontades, para sempre fazer por mim e para meu irmão Eduardo, aquele menino chorão e bravo que também aprendi muito. Quero cuidar de vocês na velhice,

com todo amor e carinho, retribuir e oferecer um pouco do que vocês fizeram e fazem. Como muitos dizem, "pai e mãe deveriam ser para sempre", amo muito vocês e quero sempre vocês ao meu lado até quando puder.

À prof.^a Roberta Okamoto, minha orientadora e querida por todos nós...

Minha profunda admiração, uma mistura de elegância e inteligência. Com a senhora APRENDI a estudar, nos ensinou que estudar não é chato, é sempre instigante. Eu cresci muito cientificamente, fui, estou indo e quero ir muito mais onde nunca pensei que um dia eu chegaria. Professora muito obrigada pelas oportunidades por cada ensinamento e crescimento científico, quero que saiba que és um espelho, sempre procuramos a chegar pelos perto de toda a sua exuberante inteligência e elegância. NOSSA MÃE CIENTÍFICA, muito obrigada pelos ensinamentos e momentos de muita ríada e descontração.

À minha Banca Examinadora...

Formada por dois professores muito queridos e cativantes, que transmitem o ensinamento de forma leve, fluída e com muita alegria. Professor Francisley Ávila e Professo André Fabrís, fico muito feliz por ter vocês como minha banca examinadora, agradeço imensamente pelo aceíte do convíte.

Ao meu namorado, Danilo Masocatto, Lindão para muitos e Tesouro só para mim...

Sabe aquela pessoa que sempre pedi a Deus?!?! É você. Sou muito grata por isso. Maís de uma década ao seu lado. Somos os opostos com muito amor, não falo que a gente se completa, porque para oferecer algo, temos que estar cheíos e transbordando e no nosso caso é o amor. Tenho tanto amor que não cabe no peito e que sorte a minha eu encontreí você, enviado por Deus para mim. Te amo meu Tesouro (Lindão).

Aos meus amigos do nosso laboratório...

“Essa família é muito unida, e também muito ouriçada, brigam por qualquer razão, mas acabam pedindo perdão”. A música perfeita, que descreve nós do Laboratório para Estudos de Tecidos Mineralizados. Com certeza somos uma família, e aprendemos muito mais juntos, e é junto que nos divertimos, brincamos, brigamos, nos desculpamos, mas o que importa é que no final tudo fica bem.

Aos meus amigos e professores do famoso
departamento

ANATO & HISTO

Sabe aquele lugar que você ama ir?!? É esse departamento, cheio de pessoas agradáveis, departamento leve, alegre, contagiante. Todos gostariam de fazer parte deste departamento, mas são poucos que tem esse privilégio.

Aos Professores do departamento 10A que de
alguma forma também são especiais...

Todos foram essenciais para a minha formação. Só tenho que agradecer pelas oportunidades que tive aqui, nesta instituição, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP. Muito grata por todo o conhecimento adquirido e por todas as oportunidades ofertadas.

Aos meus eternos amigos da Turma VX

Diego, Lía, Roberta, Cíntia e Gleíce, sou extremamente grata pela amizade de vocês. Mesmo longe, cada um no seu caminho, mantemos essa amizade de forma saudável e com muita troca de informações. Tenho certeza que vou levar a amizade de vocês comigo, de forma presente ou abstrata do coração, muito obrigada por todos os anos de amizade.

Aos que contribuem para o funcionamento
da FOA

Mesmo em meio a pandemia, vocês são fundamentais para o funcionamento da faculdade. Muito obrigada pela dedicação de vocês.

Universidade, Diretor e Vice

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Titular Gláuco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem.

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. Assoc. André Luís Fraga Briso.

Às instituições de apoio financeiro à
pesquisa

Muito obrigada à Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código de financiamento 001) e à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2019/13954-9) pelo investimento à pesquisa do Brasil.

Epígrafe

“A bênção do Senhor é que enriquece, e não
traz consigo dores.”

Provérbios 10:22

HASSUMI, J. S. **Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome.** 2021. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a ação sinérgica do risedronato de sódio sistêmico e da genisteína administrada localmente, através da funcionalização de implantes, de ratas submetidas a ovariectomia e com hábitos de mimetizam a síndrome metabólica. A parte in vitro deste estudo foi executado em 2 etapas. Na primeira etapa, foi realizada a funcionalização da superfície de discos/implantes com genisteína na concentração de 100 μ M pela técnica layer by layer (lbl). Na segunda etapa foram feitos testes biológicos em culturas de células, para avaliar as propriedades da superfície funcionalizada, quanto às respostas osteogênicas. Para a cultura de células foram utilizadas células mesenquimais diferenciadas em osteoblastos, isoladas de fêmures de ratos. Após a validação pelos testes executados nas superfícies funcionalizadas, foi realizado estudo in vivo (3ª etapa). Para tanto, no dia 0, as ratas Wistar adultas jovens, fêmeas (n=64) foram divididas em 4 grupos: 1- SHAM (n= 16), animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) fictícia e dieta balanceada. 2- SHAM Síndrome Metabólica (SM) (n=16), animais foram submetidos à ovariectomia fictícia e dieta de cafeteria. 3- OVX SM (n=16), animais foram submetidos à ovariectomia bilateral e dieta de cafeteria. 4- OVX SM Risedronato (RIS) (n=16), animais foram submetidos à ovariectomia bilateral, dieta de cafeteria e tratadas com risedronato de sódio. Em cada grupo há 2 subgrupos: A- implantes convencionais e B- implantes funcionalizados com genisteína. No dia 30, foi iniciado o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio, na concentração de 0,35mg/kg, ou apenas solução salina, via gavagem, 1 vez por semana. Passados 60 dias da medicação (dia 90), todos os animais foram submetidos à cirurgia para exodontia dos 1^{os} molares superiores bilateralmente e, imediatamente, no alvéolo da raiz mesial, foi instalado os implantes com superfície convencional ou funcionalizada. Os animais foram eutanasiados aos 28 dias (dia 118) após a instalação dos implantes para mensuração do torque de falha na interface osso implante em N/cm. Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade (Shapiro Wilk). Houve a confirmação de distribuição normal dos dados amostrais e na sequência, foi realizado

o teste paramétrico ANOVA One Way or Two Way, seguido do pós teste de Tukey, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Concluiu-se que, a concentração de 100 μM da genisteína manteve a viabilidade celular e resultados favoráveis quanto a genotoxicidade. A dieta de cafeteria e a ovariectomia bilateral mimetizam a síndrome metabólica e a predisposição para osteoporose por deficiência de esteroides gonadais. E, a ação sinérgica entre fármaco sistêmico (risedronato de sódio) e genisteína local foi promissora para a melhora no processo de reparo periimplantar, principalmente no grupo SHAM e OVX SM RIS.

Palavras-chave: Osteoporose. Síndrome metabólica. Risedronato de sódio. Genisteína. Implante dentário. Osseointegração.

HASSUMI, J. S. **Evaluation of the synergistic effect between systemic Risedronate and local Genistein on peri-implant repair in strogen deficient rats and metabolic syndrome.** 2021. 66 f. Dissertation (Master's Degree) - Araçatuba School of Dentistry, Paulista State University, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the synergistic action of systemic risedronate sodium and locally administered genistein, through implant functionalization, of rats submitted to ovariectomy and with habits mimicking the metabolic syndrome. The in vitro part of this study was performed in 2 steps. In the first step, the surface functionalization of discs/implants was performed with genistein at a concentration of 100 μ M by the layer by layer (lbl) technique. In the second step biological tests were performed in cell cultures to evaluate the properties of the functionalized surface for osteogenic responses. For the cell culture, mesenchymal cells differentiated into osteoblasts, isolated from rat femurs, were used. After validation by tests performed on the functionalized surfaces, the in vivo study (third test) was performed. For this purpose, on day 0, young adult female Wistar rats (n=64) were divided into 4 groups: 1- SHAM (n=16), animals were submitted to sham ovariectomy (OVX) and balanced diet. 2- SHAM Metabolic Syndrome (MS) (n=16), animals were submitted to sham ovariectomy and cafeteria diet. 3- OVX SM (n=16), animals underwent bilateral ovariectomy and cafeteria diet. 4- OVX SM Risedronate (RIS) (n=16), animals underwent bilateral ovariectomy, cafeteria diet and treated with risedronate sodium. In each group there are 2 subgroups: A- conventional implants and B- implants functionalized with genistein. On day 30, drug treatment was started with risedronate sodium, at a concentration of 0.35 mg/kg, or just saline solution, via gavage, once a week. After 60 days of medication (day 90), all animals underwent surgery to extract the 1st upper molars bilaterally, and implants with conventional or functionalized surfaces were immediately installed in the mesial root alveolus. The animals were euthanized at 28 days (day 118) after implant installation to measure the failure torque at the implant-bone interface in N/cm. The data were submitted to the homoscedasticity test (Shapiro Wilk). The normal distribution of the sample data was confirmed and then the parametric One Way or Two Way ANOVA test was performed, followed by Tukey's post-test, with a significance level of 5% ($p < 0.05$). It was concluded that, the concentration of 100 μ M of genistein maintained cell viability and favorable

results regarding genotoxicity. The cafeteria diet and bilateral ovariectomy mimic the metabolic syndrome and predisposition to osteoporosis by gonadal steroid deficiency. And, the synergistic action between systemic drug (risedronate sodium) and local genistein was promising for the improvement in the periimplant repair process, especially in the SHAM and OVX SM RIS groups.

Keywords: Osteoporosis. Metabolic syndrome. Risedronate sodium. Genistein. Dental implantation. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Dimensões do implante que foi instalado na maxila dos ratos.	30
FIGURA 2 – Tempo experimental dos grupos SHAM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar.	35
FIGURA 3 – Tempo experimental dos grupos SHAM SM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar.	35
FIGURA 4 – Tempo experimental dos grupos OVX SM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar.	36
FIGURA 5 – Tempo experimental dos grupos OVX SM RIS (C e G) referentes a avaliação peri-implantar.	37
FIGURA 6 – Imagens representativas da cirurgia de ovariectomia mostrando a tricotomia (A), local da incisão (B), exposição do ovário (C), ligadura (D), remoção do ovário (E), sutura final (F).	38
FIGURA 7 – Alimentação dos animais do grupo SM, seguindo os modelos de Gomez-Smith, et al. (2016) e Carillon et al. (2013).	39
FIGURA 8 – Imagens representativas da cirurgia de exodontia do 1º molar superior.	41
FIGURA 9 – Imagens representativas da cirurgia de instalação imediata do implante no alvéolo da raiz mesial, após a exodontia do 1º molar superior.	42
FIGURA 10 - Imagens da necropsia. Macroscopicamente observou-se a quantidade/excesso de gordura entre os órgãos internos dos animais dos grupos SHAM (A), SHAM SM (B), OVX SM (C) e OVX SM RIS (D).	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a superfície do implante. 37

TABELA 2 - Quantidade de alimento dada para os animais por dia. 39

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – Resultados referentes ao MTT onde foi avaliado o metabolismo celular das células em contato com a concentração de 100µM de Genisteína (tratamento) aos 3, 7 e 14 dias (tempo), após o plaqueamento. Quando avaliada a interação entre os fatores Tratamento e Tempo, não foi observada interação entre estes ($p=0,9926$) e observou-se diferença estatisticamente significativa na variável tempo ($p<0,0001$) (*). Pode-se observar que aos 7 dias, observa-se maior absorbância em comparação aos demais períodos avaliados. 45
- GRÁFICO 2 – Valores representativos da viabilidade celular, em porcentagem, calculada a partir dos valores de absorbância para as superfícies convencional e Genisteína 100µM. Estes resultados nos deixaram seguros quanto a seleção da concentração testada neste estudo. 46
- GRÁFICO 3 – Resultados referentes a formação de nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento das células sobre as superfícies funcionalizadas com a genisteína 100 µM neste estudo. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies testadas $p>0,05$. 47
- GRÁFICO 4 – Valores representativos quanto ao número de micronúcleos formados na presença das superfícies testadas: convencional, genisteína 100µM. A partir da aplicação do teste ANOVA 2 fatores (tratamento x tempo), observa-se que não houve interação entre tratamento e tempo ($p=0,2450$), não houve diferença estatisticamente significativa considerando-se tempo ($p=0,0637$) e tratamento ($p=0,1895$). 48
- GRÁFICO 5 – Valores médios dos pesos dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p<0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p<0,05$) em comparação com SHAM SM em T0 (a), OVX SM em T0 (b) e OVX SM RIS em T0 (c). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) na comparação em T60 com SHAM (d), T88 com SHAM (e) e SHAM SM (f). 50

GRÁFICO 6 – Valores médios da glicemia dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p < 0,05$) em comparação com OVX SM em T60 (a) e OVX SM RIS em T0 (b). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na comparação em T60 com SHAM (c), SHAM SM (d) e OVX SM (e).

51

GRÁFICO 7 – Valores médios do índice de Lee dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Vale destacar que o índice de Lee é um parâmetro que relaciona a circunferência abdominal e a distância naso-caudal dos animais. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p < 0,05$) em comparação com SHAM SM em T0 (a), OVX SM em T0 (b) e OVX SM RIS em T0 (c). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na comparação em T60 com SHAM (d) e em T88 com SHAM (e).

52

GRÁFICO 8 – Valores médios obtidos no torquímetro digital durante a remoção dos implantes aos 28 dias pós-operatórios. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA two way, tendo como fatores avaliados a condição sistêmica dos animais e a superfície dos implantes testados. Havendo diferenças entre os fatores, foi aplicado o pós teste de Tukey, com nível de significância de ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável superfície funcionalizada com genisteína ($p < 0,05$) em comparação com SHAM (a), SHAM SM (b) e OVX SM (c).

53

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento/porcentagem
<	Menor
μM	Micromolar
C ou CONV	Convencional
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Cols.	Colaboradores
D	Dia(s)
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Gramas
G ou GEN	Genisteína
HDL	High density lipoprotein
ICT	Instituto de Ciência e Tecnologia
kg	Quilogramas
LBL	Layer by layer
LEIC	Laboratório de Estudo Interdisciplinar em Células
LSMT	Laboratório de Estudos de Tecidos Mineralizados
mg	Miligrama

ml	Mililitros
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
N	Newtons
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OVX	Ovariectomia
PSS	Poliestireno sulfonado
PVPI	Polivinilpirrolidona iodo tópico
Ris	Risedronato de sódio
rpm	Rotação por minuto
SBF	Soro fetal bovino
SM	Síndrome metabólica
SP	São Paulo
T	Tempo
TiO ₂	Dióxido de titânio
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVO	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 1ª etapa – Funcionalização da Superfície dos discos/implantes e sua caracterização Físico-Química e Biológica	30
3.1.1 Discos/implantes utilizados na pesquisa	30
3.1.2 Tratamentos medicamentosos na superfície dos discos/implantes	30
3.2 2ª etapa – Cultura de células da superfície dos discos funcionalizados	31
3.2.1 Experimentos de Cultura de Células, para validação biológica das superfícies a serem estudadas	31
3.2.2 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	31
3.2.3 Determinação da viabilidade celular	32
3.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização	33
3.2.5 Teste de micronúcleos	33
3.3 3ª - etapa da Pesquisa- Experimentos in vivo com o Modelo Experimental proposto	34
3.3.1 Delineamento experimental	34
3.3.2 Animais	37
3.3.3 Ciclo estral	37
3.3.4 Cirurgia de ovariectomia	38
3.3.5 Síndrome Metabólica - Dieta de cafeteria	39
3.3.6 Tratamento medicamentoso sistêmico com risedronato de sódio	40
3.3.7 Técnica cirúrgica para extração dental	40
3.3.8 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis na maxila	41
3.3.9 Eutanásia e análise biomecânica (torque reverso dos implantes)	42

3.4 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Experimentos in vitro	44
4.2 Experimentos in vivo	48
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica e multifatorial, caracterizada pela alteração da macrogeometria, deterioração da microarquitetura óssea [1], redução da massa óssea, aumento da fragilidade [2] e, se mantém silenciosa e assintomática até ocorrer uma fratura [3]. Segundo a American Association of Clinical Endocrinologists, é a doença óssea mais comum, aumenta à medida que a população envelhece [4] e, estilo de vida não saudável, doenças e medicamentos, também podem influenciar negativamente as propriedades mecânicas óssea [1,2]. Com isso, os gastos com saúde tanto para o paciente quanto para o sistema de saúde aumentam significativamente [5,6], devido a dor crônica, risco de fraturas, incapacidade a longo prazo e até pela morte prematura [2,7].

Outra alteração metabólica que vem chamando atenção, também, pela alta prevalência global é a síndrome metabólica. Segundo a National Cholesterol Education Program's Adult – Treatment Panel III, atinge de 8- 24% dos homens e 7- 46% das mulheres [4,8] e, é caracterizada pela coexistência de pelo menos três das seguintes alterações: obesidade abdominal (circunferência $\geq 88\text{cm}$), hipertensão arterial ($\geq 130 \times 85\text{mmHg}$), hiperglicemia ($\geq 100\text{mg/dl}$) e dislipidemia (triglicerídeos $\geq 150\text{mg/dl}$ e níveis de colesterol-HDL $\leq 50\text{mg/dl}$) [2,4,6,8,9,10,11]. Como na osteoporose, a prevalência aumenta conforme a idade, porém, nos homens a prevalência está aumentada da faixa etária de 20-50 anos, já nas mulheres, aumenta a partir dos 50 anos [8]. É uma doença multifatorial e está associada a inflamação crônica, excesso de ingestão calórica, obesidade e sedentarismo [6,8,9].

Assim, a osteoporose e a síndrome metabólica apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, ambas são fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus do tipo 2 e acidente vascular cerebral [4,6,9,10] e causam sérios problemas de saúde e encargos socioeconômicos em todo o mundo [2,12]. Do ponto de vista fisiopatológico, a osteoporose e a síndrome metabólica compartilham fatores de riscos e fisiológicos, como o envelhecimento, sexo, estilo de vida, estado nutricional, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento do estresse oxidativo [3,5]. Várias vias parecem conectar as duas condições sistêmicas, pois, o tecido ósseo e adiposo são originados de células mesenquimais indiferenciadas e contêm tendências iguais para a diferenciação em adipócitos e

osteoblastos, mas, o aumento de diferenciação em adipócitos pode suprimir a diferenciação em osteoblastos [6,12].

O objetivo do tratamento da osteoporose é amenizar os sintomas e reduzir o risco de fratura [13]. Desta forma, a terapia farmacológica pode ser através de agentes antirreabsortivos e/ou anabólicos [8]. Os bifosfonatos, moduladores seletivos de receptores de estrógenos e o anticorpo monoclonal, o denosumab são classificados como antirreabsortivos. Já, a teriparatida e o ranelato de estrôncio são fármacos anabólicos que favorecem a neoformação óssea [8]. Ainda que, há grande variedade de opções de medicamentos, os bifosfonatos são a primeira escolha para o tratamento a osteoporose [8]. Mais especificamente, neste estudo utilizamos o Risedronato de Sódio, composto nitrogenado que, na via do mevalonato, induz a apoptose dos osteoclastos por inibir a enzima importante para a ativação dos osteoclastos, a farnesil pirofosfato sintase [1]. Desta maneira, diminui a reabsorção e aumenta a densidade mineral óssea. Também, há diminuição da remodelação óssea e, o uso contínuo pode acumular danos, microfraturas ósseas e causar efeitos colaterais como fraturas atípicas de baixa energia e osteonecrose dos maxilares. Esta última condição é importante para a odontologia e, há estudos do nosso laboratório que mostram prejuízos no reparo alveolar e periimplantar de ratas osteoporóticas tratadas com o alendronato de sódio.

No entanto, terapias modificadas e novas drogas estão surgindo para combater as desvantagens ou efeitos colaterais associados aos tratamentos. Essas abordagens visam vias recém-descobertas envolvidas na formação de osteoclastos, aumentam a afinidade com drogas ou melhoram a focalização óssea [1]. Com isso, as terapias naturais vieram com a finalidade de prevenir e/ou auxiliar no tratamento da osteoporose. Uma delas é a genisteína, fitoestrógeno encontrado abundantemente na soja e contém estrutura química semelhante ao estradiol. É um natural modulador seletivo dos receptores de estrógenos e pode regular de forma positiva o metabolismo ósseo. Evidências na literatura, mostram em estudos in vitro, em cultura de células, a formação de nódulos de mineralização, e também, de estudos em nosso laboratório podemos observar efeito favorável sobre a dinâmica da precipitação de Cálcio na matriz de colágeno do tecido ósseo.

Assim, este estudo foi elaborado para observar a ação sinérgica do medicamento sistêmico, risedronato de sódio, com o administrado localmente, através

da funcionalização de implantes com genistina no reparo peri-implantar de ratas submetidas a ovariectomia e com hábitos de mimetizam a síndrome metabólica.

2 OBJETIVO

Avaliar a ação sinérgica entre o risedronato de sódio e a genisteína administrados de forma sistêmica e local, repectivamente, sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno e síndrome metabólica.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 1ª etapa – Funcionalização da Superfície dos discos/implantes e sua caracterização Físico-Química e Biológica

3.1.1 Discos/implantes utilizados na pesquisa

Para esta pesquisa, foram utilizados discos/implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil). As dimensões do implante eram de 1,4 mm de diâmetro e 2,7 mm de altura, esterilizados por raios gama (Figura 1).

FIGURA 1 – Dimensões do implante que foi instalado na maxila dos ratos



Fonte: Autora, 2021

3.1.2 Tratamentos medicamentosos na superfície dos discos/implantes

A superfície dos disco/implantes foi funcionalizada pela preparação de filmes LbL. Tal técnica consiste na imersão de um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície) por um determinado intervalo de tempo numa solução aquosa contendo o material a ser depositado. A carga deste material deve ser contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática. Posteriormente, o conjunto substrato + monocamada foi lavado a fim de eliminar o excesso de material. Em seguida foi imerso numa solução contendo um

outro material, agora de carga contrária à do material inicialmente depositado, formando assim os filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas. O novo conjunto substrato + bicamada é lavado e pode ser seco novamente em estufa a 60°C. A técnica LbL tem como vantagens a simplicidade dos materiais envolvidos para a formação de multicamadas, o substrato pode ser de qualquer geometria e o solvente comumente empregado é a água. Foram empregados o eletrólito poliestireno sulfonado (PSS) (carga negativa), no qual os fármacos estavam dispersos, e uma solução de eletrolítica de TiO₂ (carga positiva) previamente preparada pelo método sol-gel [14]. Como mencionado, a solução de PSS foi preparada contendo genisteína.

O crescimento de filmes pela técnica LbL foi realizada sob supervisão Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho. Vale destacar que o grupo de pesquisa do Professor Paulo possui ampla experiência quanto a funcionalização de superfícies de implantes, o que foi fundamental para o desenvolvimento desta etapa do processo, bem como para a caracterização físico-química das superfícies desenvolvidas [15,16]. Durante a padronização do protocolo de lbl com a genisteína, foram produzidos discos de titânio, fornecidos pela Emfils, para que estes fossem utilizados nos experimentos de culturas de células.

3.2 2ª etapa – Cultura de células da superfície dos discos funcionalizados

3.2.1 Experimentos de Cultura de Células, para validação biológica das superfícies a serem estudadas

As superfícies funcionalizadas pelos fármacos foram avaliadas biologicamente, a partir de experimentos em culturas de células que foram desenvolvidos no laboratório da Professora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP.

3.2.2 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

Todos os passos referentes à cultura celular foram realizados no Laboratório de Estudo Interdisciplinar em Células (LEIC) do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do ICT – UNESP São José dos Campos – SP.

Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque). No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura osteogênico de acordo com Rosa et al. [17]. Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Nunc, Dinamarca) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente [17]. Foram plaqueadas 15.000 células viáveis em cada poço da microplaca de 24 poços (Nunc, Dinamarca), sendo acrescentado meio de cultura osteogênico para obtenção do volume final de 1 mL. Estas placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e os osteoblastos de todos os grupos foram avaliados quanto a viabilidade celular, o conteúdo de proteína total, a atividade de fosfatase alcalina, a formação de nódulos de mineralização e o citoesqueleto celular. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicata [18], sendo que cada triplicata foi um *pool* de células provenientes do fêmur de 4 animais de cada grupo. O grupo controle a ser utilizado em todos os testes foi a superfície com duplo ataque ácido da empresa Emfils®.

3.2.3 Determinação da viabilidade celular

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilmetano] (Sigma Aldrich) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Como controle positivo foi utilizado solução de fenol a 0,2% e o controle negativo será o fundo da placa. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços

e avaliadas após os períodos de 03, 07 e 14 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU), de acordo com Andrade et al. [19]. Os dados foram aferidos como absorbância.

3.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização

As células, serão incubadas a 37°C/5% de CO₂ por 10 e 14 dias e após este período será quantificada a formação de nódulos de mineralização, utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma Chemical, USA), que foi mensurada no espectrofotômetro a 405nm, de acordo com Andrade et al. [19]. Os valores foram obtidos em absorbância.

3.2.5 Teste de micronúcleos

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

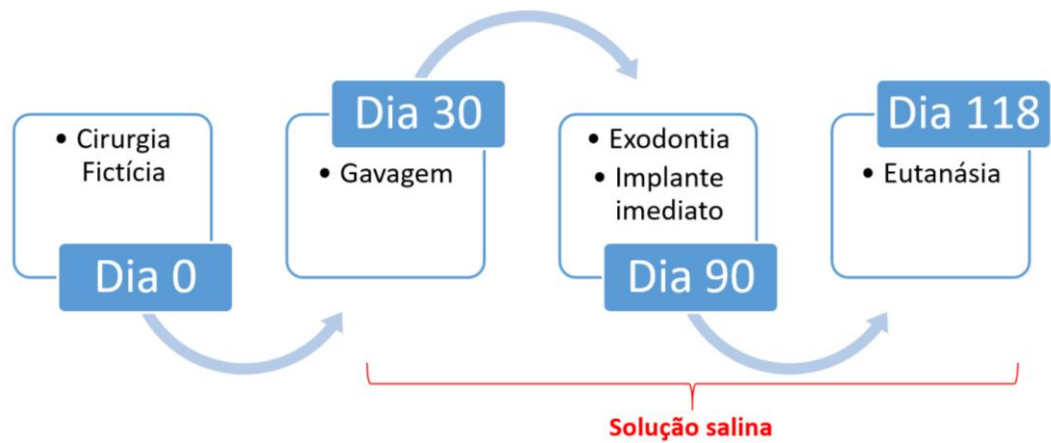
3.3 3ª - etapa da Pesquisa- Experimentos in vivo com o Modelo Experimental proposto

3.3.1 Delineamento experimental

A linha do tempo englobando os procedimentos experimentais a serem realizados pode ser visualizado nas figuras 2, 3, 4, 5 e tabela 1. Foram utilizadas 64 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, submetidas a cirurgia de ovariectomia e portadoras de síndrome metabólica, tratadas ou não com risedronato de sódio sistêmico, quando foi avaliado o reparo ósseo peri-implantar. O fármaco administrado localmente foi a genisteína. Essa substância foi incorporada aos implantes a serem instalados na maxila das ratas. A incorporação do fármaco às superfícies dos implantes e os testes em experimentos de culturas de células foram realizados na 1ª. fase desta pesquisa.

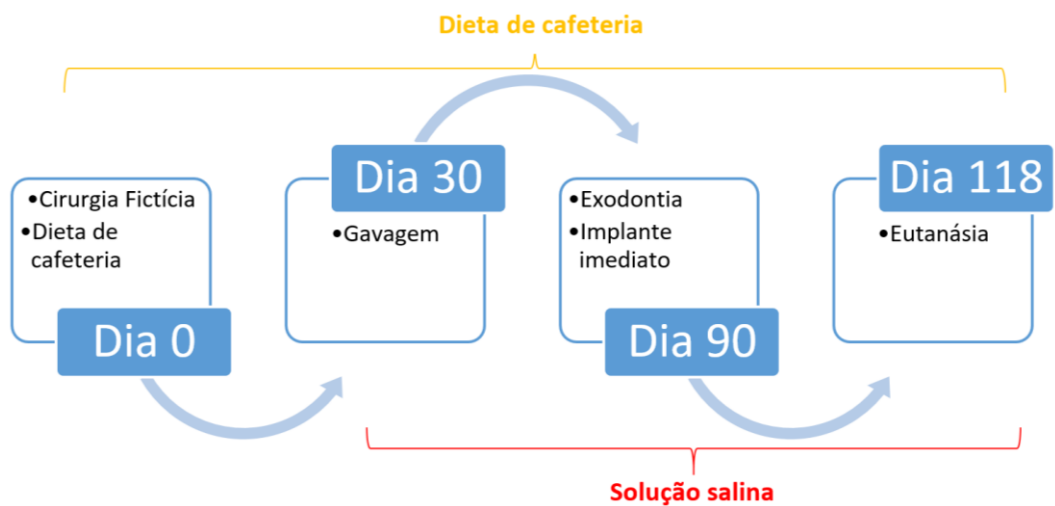
No tempo zero, as ratas selecionadas para o experimento foram submetidas a cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia bilateral. Após a recuperação da cirurgia, os animais receberam a dieta de cafeteria para a determinação da Síndrome Metabólica. Passados 30 dias (t=30d), o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio (0,35mg/kg/semana) ou veículo, via gavagem, foi iniciado. Aos 60 dias após o início do tratamento medicamentoso (t = 90d) foram feitas as cirurgias de exodontia dos 1os molares superiores bilateralmente, seguida da instalação imediata dos implantes com superfície convencional ou tratada com a genisteína local. Aos 28 dias após a instalação dos implantes (t= 118d), os animais foram anestesiados e os implantes foram removidos utilizando o torquímetro, para obtenção dos dados quanto ao torque de remoção.

FIGURA 2 – Tempo experimental dos grupos SHAM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar



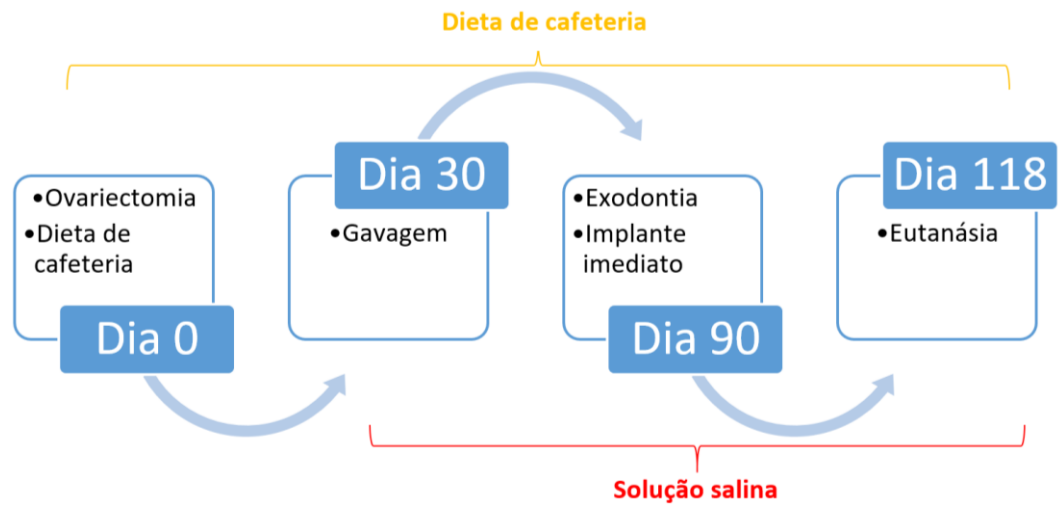
Fonte: Autora, 2021

FIGURA 3 – Tempo experimental dos grupos SHAM SM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar



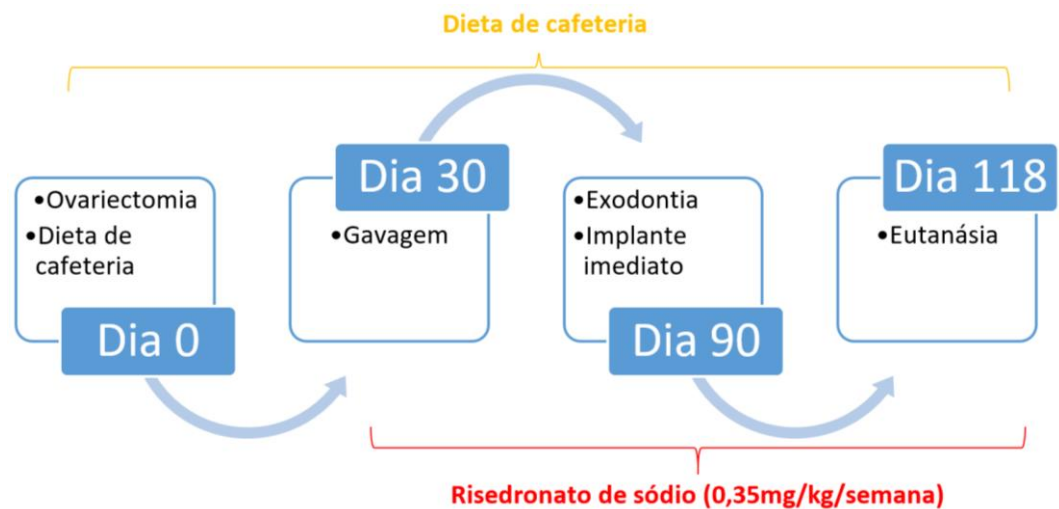
Fonte: Autora, 2021

FIGURA 4 – Tempo experimental dos grupos OVX SM (C e G) referentes a avaliação peri-implantar



Fonte: Autora, 2021

FIGURA 5 – Tempo experimental dos grupos OVX SM RIS (C e G) referentes a avaliação peri-implantar



Fonte: Autora, 2021

TABELA 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a superfície do implante

Grupo	Implante convencional	Implante funcionalizado	(n) Total
SHAM	8	8	16
SHAM SM	8	8	16
OVX SM	8	8	16
OVX SM RIS	8	8	16

Fonte: Autora, 2021

3.3.2 Animais

Os procedimentos a serem executados no presente projeto foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição, recebendo a autorização para a sua execução sob o protocolo número 566-2019. As ratas, ao início do experimento apresentaram a idade de 4 meses, foram mantidas em biotério climatizado e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas e receberão água ad libitum. Em função do modelo de síndrome metabólica, após 1 semana no biotério para adaptação às condições ambientais, recebendo ração de composição nutricional balanceada e água ad libitum, as ratas passaram a receber dieta de cafeteria, como foi descrito na sequência, sendo mantida a água ad libitum.

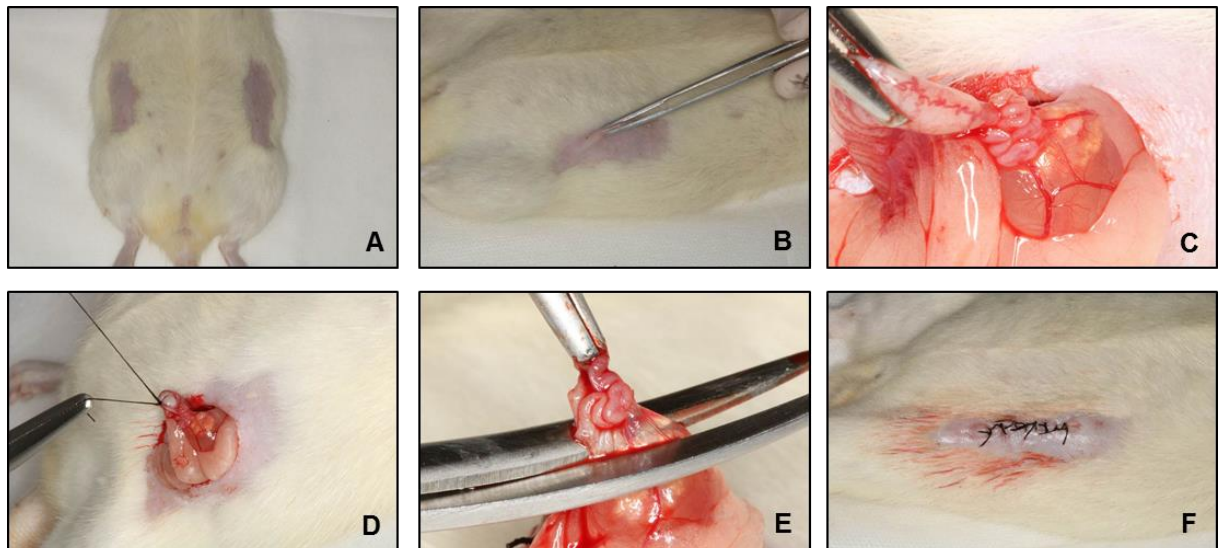
3.3.3 Ciclo estral

Para garantir que as ratas selecionadas para os experimentos estejam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata técnica de Long e Evans [20] para reconhecimento das 4 fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares. Vale destacar que esta técnica foi utilizada novamente com o intuito de validar a cirurgia de ovariectomia bilateral realizada.

3.3.4 Cirurgia de ovariectomia

As ratas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, foi realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, serão localizados os ovários e os cornos uterinos que serão laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi realizada a remoção dos ovários. Finalizado, foi feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). As ratas do grupo sham passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção.

FIGURA 6 - Imagens representativas da cirurgia de ovariectomia mostrando a tricotomia (A), local da incisão (B), exposição do ovário (C), ligadura (D), remoção do ovário (E), sutura final (F)



Fonte: Autora, 2021

3.3.5 Síndrome Metabólica - Dieta de cafeteria

Foi oferecida uma dieta de alta densidade energética (hiperlipídica) de cafeteria [21,22], durante todo o experimento.

FIGURA 7 - Alimentação dos animais do grupo SM, seguindo os modelos de Gomez-Smith et al. [23] e Carillon et al. [24]



Fonte: Autora, 2021

Para cada animal foi pesado diariamente uma quantidade de 30g da alimentação, que variará entre bolachas recheadas, bolachas tipo “waffer”, salgadinho de milho e também uma garrafa de água com uma concentração de 12% de sacarose (Tabela 2).

TABELA 2 – Quantidade de alimento dada para os animais por dia

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

Fonte: Autora, 2021

Foi realizado quinzenalmente o controle de peso, glicemia, índice de Lee para que se pudesse acompanhar o desenvolvimento das alterações metabólicas nos animais experimentais.

3.3.6 Tratamento medicamentoso sistêmico com risedronato de sódio

O risedronato de sódio foi administrado na dosagem de 0,35 mg/kg/semana, de acordo com as orientações na bula do medicamento, através de gavagem. O início da sua administração foi aos 30 dias após a cirurgia de ovariectomia e foi mantido ao longo de todo o experimento. Utilizando uma agulha curva de gavagem (Insight equipamentos), a medicação diluída em água foi administrada semanalmente. O volume final administrado será de 0,3ml.

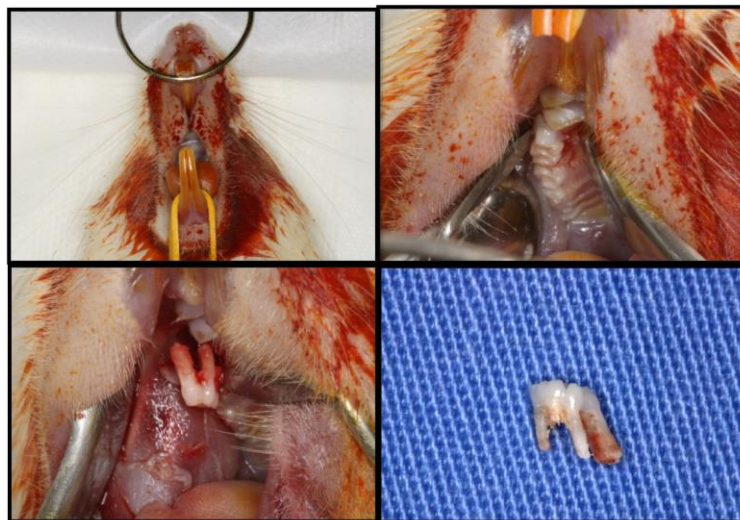
3.3.7 Técnica cirúrgica para extração dental

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

Após a sedação, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica confeccionada especialmente para procedimentos cirúrgicos em roedores, favorecendo a manutenção da cavidade bucal aberta e proporcionando um posicionamento adequado para o procedimento de exodontia, antissepsia da região com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Após antissepsia a exodontia dos primeiros molares superiores foram realizadas com o auxílio de um esculpidor Hollenbeck nº 3S (Quinelato, Rio Claro – SP), para a realização da diérese; sindesmotomia, em seguida a luxação do primeiro molar superior com o esculpidor de hollenbeck 3S utilizando o princípio de uso em forma de cunha e alavanca, para em seguida realizar a elevação do elemento dentário (exodontia).

FIGURA 8 – Imagens representativas da cirurgia de exodontia do 1º molar superior



Fonte: Ana Cláudia Ervolino da Silva, 2021

3.3.8 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis na maxila

No mesmo tempo cirúrgico em que foi realizada a exodontia dos 1os molares superiores, foi realizada a instalação imediata dos implantes osseointegráveis tendo como referência o alvéolo da raiz méso-vestibular dos 1os molares extraídos.

Foram instalados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil), com diâmetro de 1,4 mm e altura de 2,7 mm, esterilizados por raios gama (Figura 1), submetidos (grupo experimental) ou não (grupo controle) à funcionalização das superfícies com genisteína, o fármaco proposto neste estudo. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,2 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 2,0mm, com travamento e estabilidade inicial.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada região de primeiro molar superior. Para o fechamento dos tecidos (síntese), foi utilizado o fio

monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos.

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

FIGURA 9 – Imagens representativas da cirurgia de instalação imediata do implante no alvéolo da raiz mesial, após a exodontia do 1º molar superior



Fonte: Ana Cláudia Ervolino da Silva, 2021

3.3.9 Eutanásia e análise biomecânica (torque reverso dos implantes)

Para a análise biomecânica, aos 28 dias após a exodontia dos 1os molares superiores e instalação imediata dos implantes, os animais foram sedados com cloridrato de quetamina e xilazina e as maxilas foram acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital foi acoplado ao monta-implante.

Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registre o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos, seja dos experimentos de culturas de células, caracterização clínica dos animais e torque de remoção, foram submetidos a análise estatística pelo software GraphPad Prisma 7.01. Os valores foram tabulados, submetidos ao teste de homocedasticidade para posterior avaliação por testes paramétricos ou não paramétricos, estabelecido o nível de significância ($p < 0,05$). Os dados obtidos neste estudo foram paramétricos, utilizando-se o teste ANOVA um fator ou dois fatores, com pós teste de Tukey e nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos in vitro

A determinação do protocolo de LbL com a última camada composta de genisteína (1^a. Etapa deste estudo) foi realizada junto com os experimentos de cultura de células (2^a. etapa), a fim de que a superfície funcionalizada fosse testada nas células em cultura, determinando se a concentração utilizada seria segura para os experimentos in vivo (3^a. etapa do estudo). Para tanto, durante a 1^a. e 2^a. etapa, foram utilizados discos de titânio com a mesma superfície convencional (tratamento vindo da fábrica doadora dos implantes) e a funcionalização foi efetuada seguindo o protocolo de LbL determinado nos experimentos preliminares, sob supervisão do Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho. A seguir, apresentaremos os resultados referentes aos experimentos em cultura de células.

Experimentos in vitro (culturas de células mesenquimais – realizado no laboratório da Profa. Luana Marotta Reis de Vasconcelos, no ICT/UNESP, em São José dos Campos). No período referente ao presente relatório, os experimentos de culturas de células foram repetidos, utilizando as concentrações da genisteína selecionada para este estudo (100µM), além dos discos controle (Titânio), sem o fármaco administrado. Para a realização de cada teste e seus diferentes períodos de análise, foram utilizados 6 discos por superfície avaliada, lembrando que os ensaios foram realizados sempre em triplicata (portanto, 18 discos por superfície testada). O preparo dos discos com a técnica de layer by layer foi realizado em nosso laboratório (LSMT), sob a orientação do Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho, da FC/UNESP em Bauru). A camada aplicada na superfície dos implantes é composta por óxido de titânio (TiO₂) e poli sódio 4 estirenosulfato (PSS), sendo finalizada por cada um dos fármacos testados em suas diferentes concentrações, como descrito a seguir:

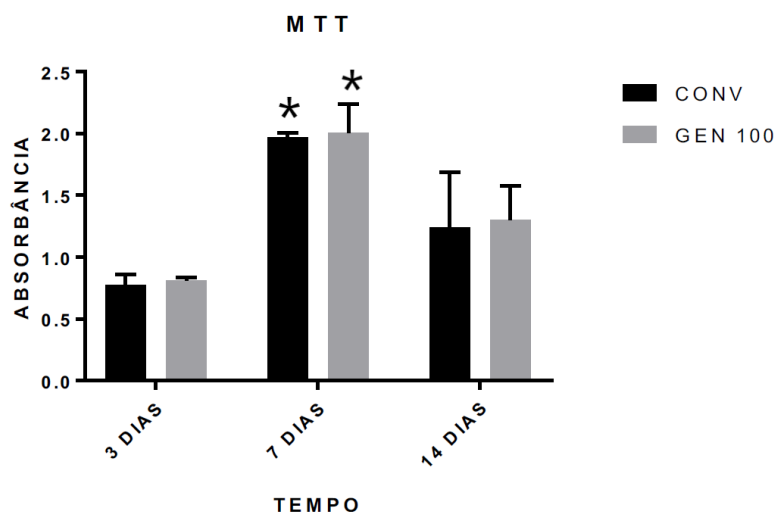
- Controle – disco de titânio sem tratamento
- Gen (+) – disco que recebeu layer by layer com Genisteína 100µM

Os testes foram realizados com culturas primárias de osteoblastos, isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, seguindo metodologia descrita na proposta inicial do nosso projeto.

Os experimentos aqui apresentados referem-se à avaliação do metabolismo celular pelo ensaio de MTT aos 3, 7 e 14 dias de plaqueamento, a avaliação dos nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento, o teste de micronúcleo (genotoxicidade) aos 5 e 10 dias de plaqueamento.

Para os resultados de MTT e nódulos de mineralização, foi realizado o plaqueamento de 15.000 células por poço (cada poço continha 1 disco de titânio). Os dados foram submetidos ao teste estatístico utilizando-se o software GraphPad Prism 7.03, onde, após o teste de homocedasticidade Shapiro Wilk, foi realizado o teste ANOVA 2 fatores, sendo considerado como fatores o tratamento (fármacos utilizados na funcionalização da superfície dos implantes) e o tempo.

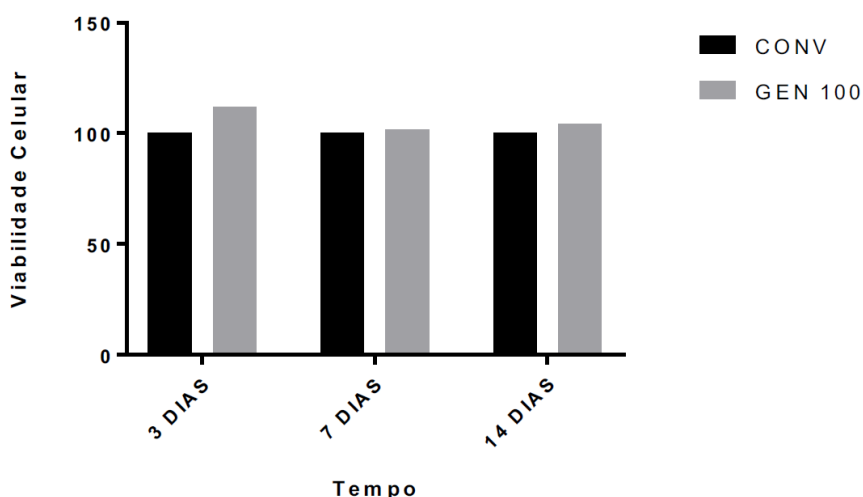
GRÁFICO 1 - Resultados referentes ao MTT onde foi avaliado o metabolismo celular das células em contato com a concentração de 100 μ M de Genisteína (tratamento) aos 3, 7 e 14 dias (tempo), após o plaqueamento. Quando avaliada a interação entre os fatores Tratamento e Tempo, não foi observada interação entre estes ($p=0,9926$) e observou-se diferença estatisticamente significativa na variável tempo ($p<0,0001$) (*). Pode-se observar que aos 7 dias, observa-se maior absorbância em comparação aos demais períodos avaliados



Fonte: Autora, 2021

Baseado nos valores médios obtidos quanto a absorbância para cada uma das concentrações de fármacos testados no disco e considerando o disco de Titânio puro como o controle, fizemos um cálculo que permitiu determinar a viabilidade celular com base nos valores observados neste experimento [25] e os valores obtidos mostraram viabilidade celular superior a 70%, o que é considerado satisfatório de acordo com ISO 9001/2000. Estes valores quanto a viabilidade celular, expressos em porcentagem, estão representados nos gráficos abaixo.

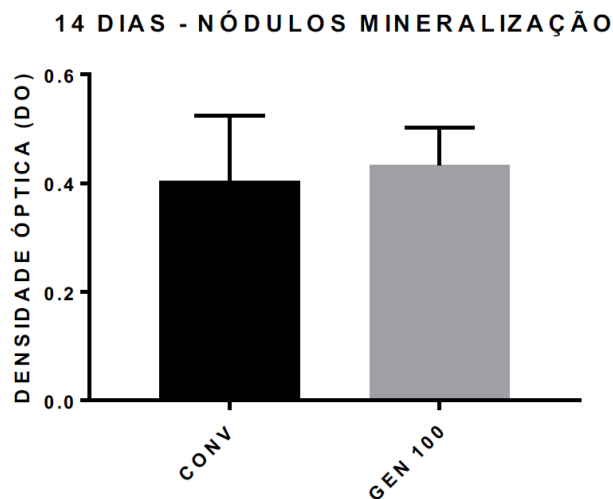
GRÁFICO 2 - Valores representativos da viabilidade celular, em porcentagem, calculada a partir dos valores de absorbância para as superfícies convencional e Genisteína 100 μ M. Estes resultados nos deixaram seguros quanto a seleção da concentração testada neste estudo



Fonte: Autora, 2021

A avaliação da formação de nódulos de mineralização foi realizada aos 14 dias após o plaqueamento das células nos discos de titânio contendo as superfícies testadas. Uma vez que foi avaliado apenas o período de 14 dias, foi aplicado o teste ANOVA One Way e pós teste de Tukey e os gráficos abaixo, representam separadamente os fármacos utilizados nas funcionalizações.

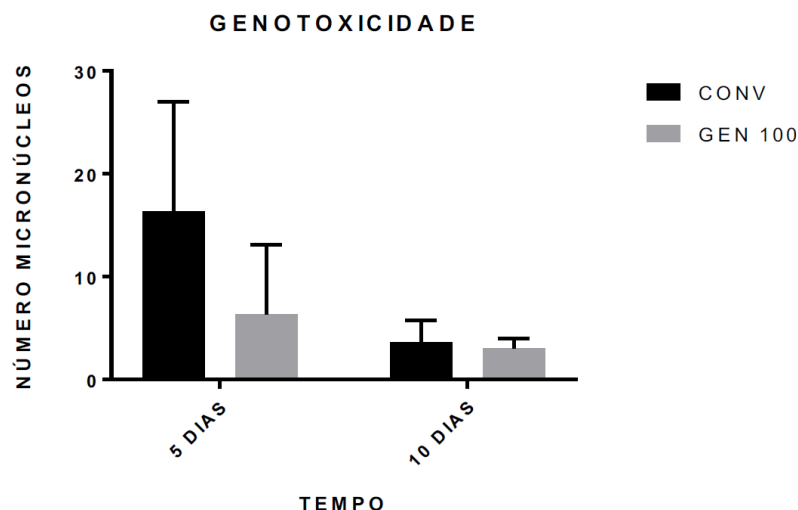
GRÁFICO 3 - Resultados referentes a formação de nódulos de mineralização aos 14 dias após o plaqueamento das células sobre as superfícies funcionalizadas com a genisteína 100 μ M neste estudo. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies testadas $p>0,05$



Fonte: Autora, 2021

Para os ensaios de genotoxicidade através da contagem de micronúcleos, foi realizado o plaqueamento de 15.000 células por poço. Os experimentos de genotoxicidade foram realizados aos 5 e 10 dias após o plaqueamento. Para a análise comparativa entre os diferentes grupos, foi realizado o teste ANOVA 2 fatores, tendo como fatores avaliados o Tratamento e Tempo. Estes resultados serão apresentados na forma de gráficos, na sequência.

GRÁFICO 4 - Valores representativos quanto ao número de micronúcleos formados na presença das superfícies testadas: convencional, genisteína 100µM. A partir da aplicação do teste ANOVA 2 fatores (tratamento x tempo), observa-se que não houve interação entre tratamento e tempo ($p=0,2450$), não houve diferença estatisticamente significativa considerando-se tempo ($p=0,0637$) e tratamento ($p=0,1895$)



Fonte: Autora, 2021

A análise conjunta dos resultados in vitro apresentados mostraram que a concentração de genisteína testada para a funcionalização dos discos de titânio manteve a viabilidade celular, mostrando resultados favoráveis também quanto a genotoxicidade. Apesar de não ter mostrado valores significativamente superior à superfície convencional quanto a formação de nódulos de mineralização, maiores valores foram observados. Portanto, a análise conjunta dos resultados mostra que a concentração selecionada para a funcionalização com genisteína da superfície dos implantes apresentou-se segura para a execução dos experimentos in vivo, mostrados na sequência.

4.2 Experimentos in vivo

Os experimentos in vivo foram executados após a autorização do comitê de ética no uso de animais, protocolo 566-2019.

Os experimentos in vitro mostraram que a concentração utilizada para a funcionalização com a genisteína foi segura para a viabilidade das células e por este motivo, demos continuidade à etapa seguinte, ou seja, os experimentos in vivo.

Baseado em todos os aspectos elencados acima, iniciamos os experimentos in vivo e apresentaremos os resultados obtidos na sequência.

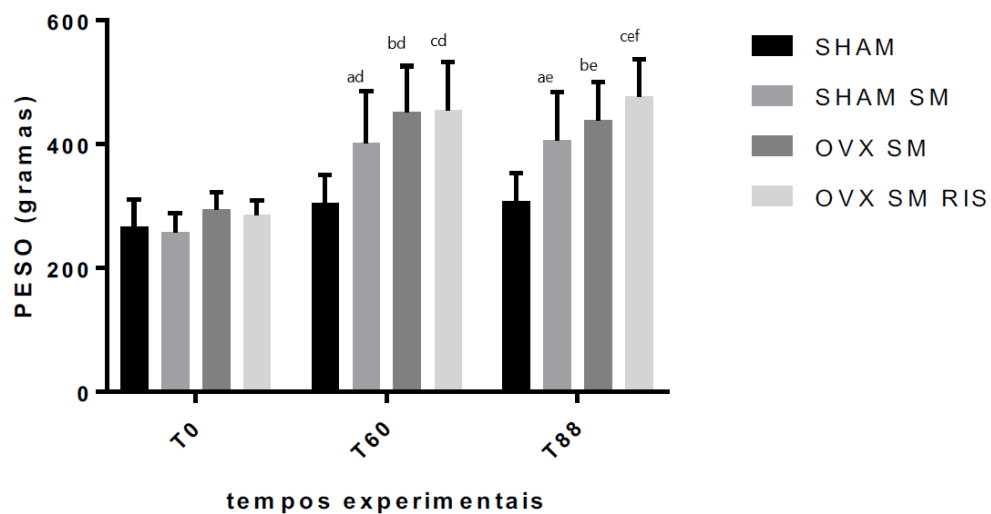
Ao iniciarmos os experimentos, em função dos grupos experimentais Sham/SM (Sham e síndrome metabólica), OVX/SM (Ovariectomia e síndrome metabólica) e OVX/SM/RIS (Ovariectomia e síndrome metabólica e tratamento oral com risedronato de sódio), coletamos dados clínicos dos animais referentes a peso, índice de Lee (em função da síndrome metabólica), glicemia (para observar uma possível resistência à insulina pela dieta hipercalórica).

Os gráficos apresentados referentes a peso, glicemia e índice de Lee foram confeccionados considerando todos os animais experimentais divididos nos 4 grandes grupos: animais controle (SHAM), animais SHAM com síndrome metabólica (SHAM/SM), animais ovariectomizados com síndrome metabólica (OVX SM), animais ovariectomizados com síndrome metabólica e tratados com risedronato de sódio (OVX SM RIS). Os períodos avaliados foram: T1, medida realizada antes da cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia, T2, medida realizada antes da exodontia/instalação dos implantes, T3, medida realizada antes da eutanásia.

Os valores médios foram submetidos à análise estatística pelo software GraphPad Prism 7.03. O teste de homocedasticidade foi o de Kolmogorov Smirnov. Foi confirmada a distribuição normal dos dados em todos os parâmetros analisados. Na sequência foi realizado o teste ANOVA Two Way, com pós teste de Tukey, nível de significância de $p < 0,05$. As diferenças encontradas entre os tempos experimentais estão descritas nas legendas de cada gráfico apresentado.

O primeiro parâmetro clínico avaliado nos 4 grupos experimentais ao longo dos 3 tempos experimentais foi o peso. O gráfico abaixo mostra os valores médios comparativos entre os grupos experimentais nos 3 tempos selecionados para a avaliação dos animais.

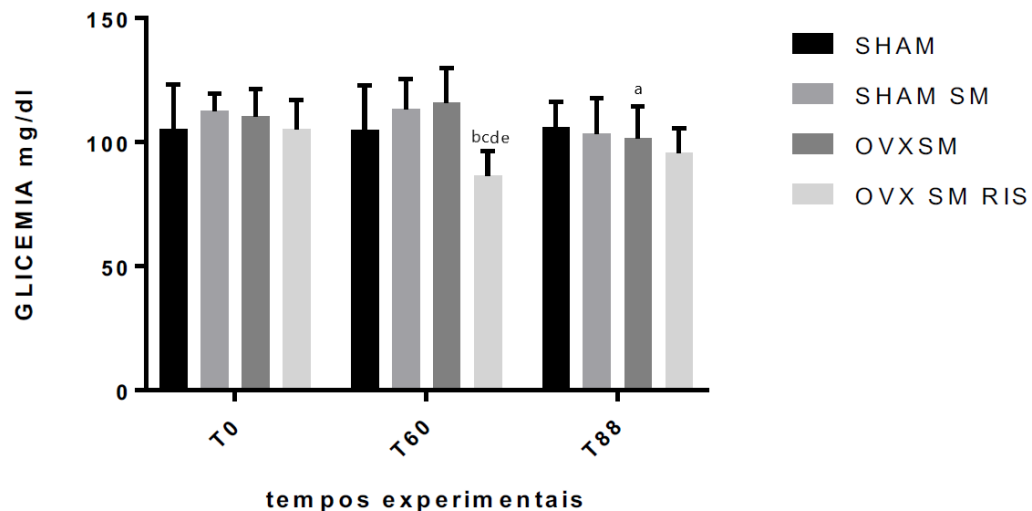
GRÁFICO 5 – Valores médios dos pesos dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p < 0,05$) em comparação com SHAM SM em T0 (a), OVX SM em T0 (b) e OVX SM RIS em T0 (c). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na comparação em T60 com SHAM (d), T88 com SHAM (e) e SHAM SM (f)



Fonte: Autora, 2021

O segundo parâmetro clínico avaliado nos 4 grupos experimentais ao longo dos 3 tempos experimentais foi a glicemia. O gráfico abaixo mostra os valores médios comparativos entre os grupos experimentais nos 3 tempos selecionados para a avaliação dos animais.

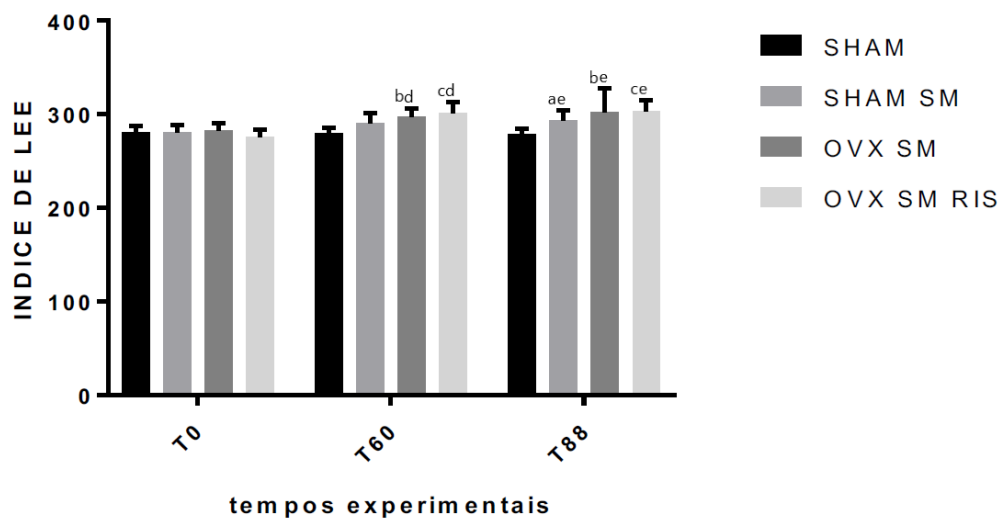
GRÁFICO 6 – Valores médios da glicemia dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p<0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p<0,05$) em comparação com OVX SM em T60 (a) e OVX SM RIS em T0 (b). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) na comparação em T60 com SHAM (c), SHAM SM (d) e OVX SM (e)



Fonte: Autora, 2021

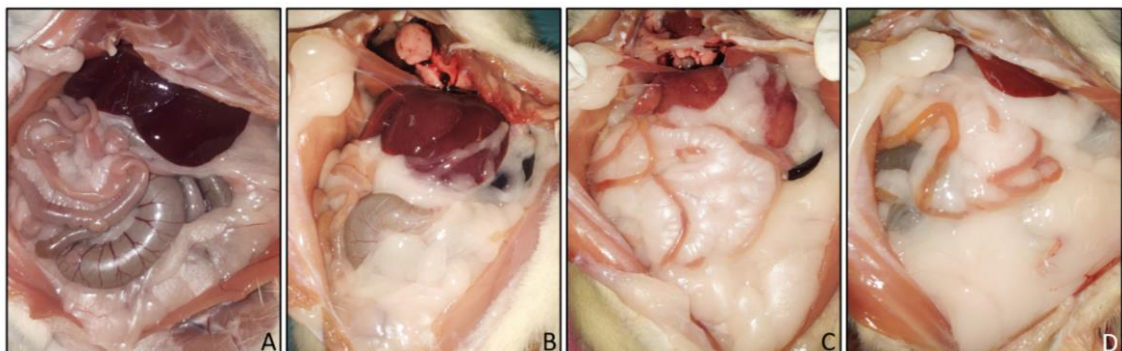
O terceiro parâmetro clínico avaliado nos 4 grupos experimentais ao longo dos 3 tempos experimentais foi a índice de Lee. O gráfico abaixo mostra os valores médios comparativos entre os grupos experimentais nos 3 tempos selecionados para a avaliação dos animais.

GRÁFICO 7 – Valores médios do índice de Lee dos animais que fazem parte dos grupos experimentais propostos neste estudo. Vale destacar que o índice de Lee é um parâmetro que relaciona a circunferência abdominal e a distância naso-caudal dos animais. Os dados foram obtidos em 3 tempos experimentais: T0 (início dos experimentos), T60 (antes da cirurgia de exodontia e instalação imediata dos implantes), T88 (28 dias após a cirurgia, na eutanásia dos animais). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 2 fatores (fator condição sistêmica e fator tempo) e quando foram observadas diferenças, foi utilizado o pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável tempo ($p < 0,05$) em comparação com SHAM SM em T0 (a), OVX SM em T0 (b) e OVX SM RIS em T0 (c). Na variável condição sistêmica observou-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na comparação em T60 com SHAM (d) e em T88 com SHAM (e)



Fonte: Autora, 2021

FIGURA 10 - Imagens da necropsia. Macroscopicamente observou-se a quantidade/excesso de gordura entre os órgãos internos dos animais dos grupos SHAM (A), SHAM SM (B), OVX SM (C) e OVX SM RIS (D)

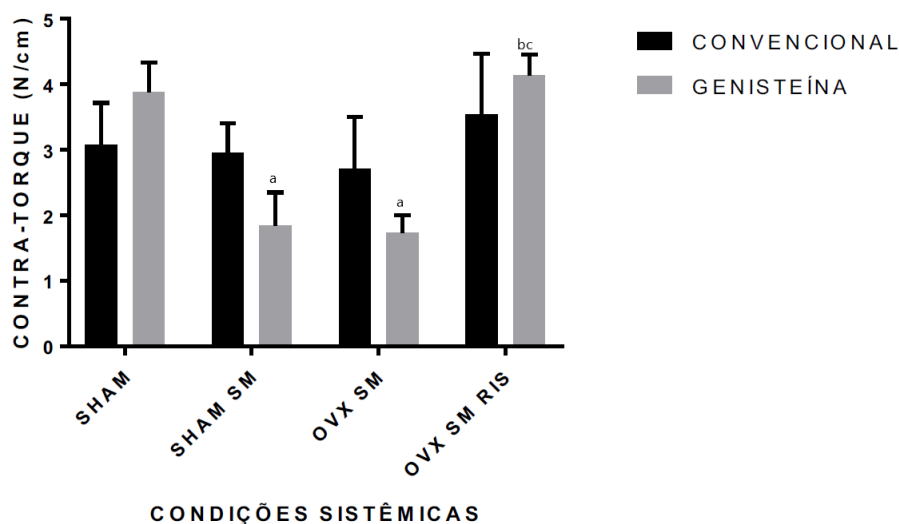


Fonte: Autora, 2021

A análise dos dados clínicos mostra que a condição experimental utilizada no estudo: ovariectomia e síndrome metabólica alteraram de forma significativa o peso

e por consequência o índice de Lee. No entanto, pouca interferência foi observada na glicemia dos animais, mostrando que o protocolo experimental adotado neste estudo quanto a dieta e cirurgia de castração bilateral interferiram na massa/peso e distribuição lipídica nos animais sem promover grandes alterações nos níveis glicêmicos. No tempo final de análise (T88) foram observadas as maiores diferenças entre os grupos experimentais. Estes resultados mostram que o modelo experimental adotado neste estudo foi eficiente para promover as alterações metabólicas que mimetizam alterações no metabolismo lipídico observado clinicamente durante a menopausa em pacientes com a perda dos esteroides gonadais. A seguir, apresentamos os dados referentes ao torque de remoção nos 4 grupos experimentais, comparando-se as duas superfícies testadas.

GRÁFICO 8 – Valores médios obtidos no torquímetro digital durante a remoção dos implantes aos 28 dias pós-operatórios. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA two way, tendo como fatores avaliados a condição sistêmica dos animais e a superfície dos implantes testados. Havendo diferenças entre os fatores, foi aplicado o pós teste de Tukey, com nível de significância de ($p < 0,05$). Observou-se diferenças estatisticamente significantes na variável superfície funcionalizada com genisteína ($p < 0,05$) em comparação com SHAM (a), SHAM SM (b) e OVX SM (c)



Fonte: Autora, 2021

Os resultados mostraram que nos grupos SHAM e OVX SM Ris, a superfície funcionalizada por genisteína resultou em maiores valores durante o torque de remoção em comparação à convencional, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas. Vale destacar que os melhores valores no torque de

remoção foram observados no grupo OVX SM Ris associado à superfície genisteína e por este motivo, sugere-se que a associação entre risedronato sistêmico e genisteína local possibilitou uma melhora na biomecânica do tecido ósseo periimplantar na condição sistêmica de deficiência de estrógeno e síndrome metabólica. No entanto, a superfície funcionalizada por genisteína isoladamente, sem a administração sistêmica de risedronato mostrou uma piora na biomecânica do tecido ósseo peri-implantar no grupo OVX SM. Este mesmo achado foi observado no grupo SM que recebeu a funcionalização por genisteína.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a funcionalização de disco de titânio puro com genisteína na concentração de 100 μM foi seguro para a viabilidade e metabolismo celular, com resultados favoráveis quanto a genotoxicidade. Por outro lado, a formação de nódulos de mineralização não mostrou valores significativamente superiores a superfície convencional, porém, valores maiores foram observados. Estudos in vitro de Wang e cols [26] mostraram que o vidro bioativo adsorvido por genisteína, aumentou a diferenciação de osteoblastos e a mineralização da matriz. Dessa forma, concluiu que tal biomaterial poderia ser bom para o tratamento de defeito ósseo e a liberação de genisteína do biomaterial poderia ser excelente para o reparo ósseo.

A osteoporose e a síndrome metabólica vêm chamando atenção pela alta prevalência global. Ambas, são doenças sistêmicas e multifatoriais, com altas taxa de morbidade e mortalidade, que aumenta a prevalência conforme a idade e estilo de vida não saudável [1,2,4,6,8,9,12]. Ainda que há grande variedade de opções de medicamentos para o tratamento da osteoporose, os antirreabsortivos, os bifosfonatos são a primeira escolha [8]. Sabe-se que os antirreabsortivos diminuem a reabsorção óssea e aumenta a densidade mineral óssea, através da diminuição da remodelação óssea [1] e, como consequência adversa podem causar prejuízos na osseointegração de implantes maxilares e osteonecrose dos maxilares [26,27].

Para o presente estudo in vivo, a condição de osteoporose foi mimetizada parcialmente pela ovariectomia bilateral e, após 30 dias iniciou-se a terapia medicamentosa com o antirreabsortivo mais utilizado pela população, o risedronato de sódio, uma vez por semana até o dia da eutanásia. 60 dias após a terapia medicamentosa, realizou-se a exodontia bilateral dos 1os molares superiores e imediatamente, no alvéolo da raiz mesial foi instalado o implante com a superfície convencional ou funcionalizada com genisteína.

A genisteína é um fitoestrógeno estudado em nosso grupo, que sistemicamente mostrou resultados positivos no reparo alveolar e periimplantar. A técnica de implante em maxila foi executada pela primeira vez em nosso grupo e consideramos essencial, pois, podemos mimetizar ao máximo a situação encontrada na clínica. Os ossos maxilares desempenham um papel fundamental na mastigação

e fonação, e clinicamente requer conhecimento detalhado dessas estruturas, pois, é um fator determinante na abordagem cirúrgica, tempo de cicatrização e reabilitação protética [28].

Nossos animais são portadores de deficiência de estrógeno, condição que predispõe a osteoporose. Dessa forma, ocorre alteração no perfil lipídico, dislipidemias e conseqüentemente o aparecimento da síndrome metabólica [29]. Esta condição foi adicionada em nosso modelo experimental, através da dieta de cafeteria [30,31] logo após a cirurgia de ovariectomia bilateral até o dia da eutanásia, 28 dias após a instalação dos implantes. Para isso, realizamos testes clínicos nos animais, para observa a evolução da síndrome metabólica durante o experimento, através de teste glicêmico e índice de Lee.

No presente estudo observamos que em T0 (início dos experimentos) os animais de todos os grupos apresentavam peso corporal semelhante e, após a ovariectomia bilateral e a introdução da dieta de cafeteria, os grupos SHAM SM, OVX SM e OVX SM RIS aumentaram significativamente o peso corporal em T60 (cirurgia – exodontia e implante imediato) e mantiveram em T88 (eutanásia). Já o grupo SHAM não alterou de forma significativa o peso corporal ao longo do experimento. Na comparação em T60 e T80 entre SHAM com os demais grupos, podemos observar que a ovariectomia e/ou a dieta de cafeteria aumentaram significativamente o peso corporal.

Nossos dados estão de acordo com Miao e cols [32], pois, os mesmos observaram valores maiores de peso corporal após a ovariectomia. Também, Coelho e cols [33], Tükel e Delilbasi [29], e Montalvany-Antonucci e cols [34] observaram que após a introdução da dieta para o desenvolvimento da síndrome metabólica, os animais tiveram aumento significativo do peso corporal.

Por outro lado, observamos pouca interferência na glicemia dos animais com dieta de cafeteria. Logo, a condição de diabetes melitus não foi confirmada ao longo do experimento. Em concordância, Coelho e cols [33] também observaram que os animais com síndrome metabólica e dieta de cafeteria apresentaram níveis de glicose semelhantes aos animais controle. Ao contrário, Tükel e Delilbasi [29] e Montalvany-Antonucci e cols [34] observaram aumento da glicose no sangue dos

animais com dieta rica em sacarose e dieta rica em carboidratos refinados, respectivamente.

Contudo a avaliação dos parâmetros do índice de Lee, observamos que os grupos com síndrome metabólica e ovariectomizados, SHAM SM, OVX SM e OVX SM RIS apresentaram significativamente índices mais elevados em T88, quando comparados em T0. Já na comparação entre o grupo SHAM com os grupos com síndrome metabólica e ovariectomizados, observamos aumento significativo do índice de Lee em OVX SM e OVX SM RIS em T60 e, em T88 houve aumento significativo em SHAM SM, OVX SM e OVX SM RIS.

Segundo, Coelho e cols [33], macroscopicamente, na necropsia, observou-se excesso de depósito de gordura ao redor dos órgãos internos. Tal informação corrobora com nossos achados clínicos, pois os animais com síndrome metabólica, durante a necropsia observamos excesso de gordura entre os órgãos internos, principalmente entre as vísceras. Estes resultados mostram que o modelo experimental adotado neste estudo foi eficiente para promover as alterações metabólicas que mimetizam alterações no metabolismo lipídico observado clinicamente durante a menopausa em pacientes com a perda dos esteroides gonadais.

No teste biomecânico, o torque para a falha na interface osso e implante em N/cm foi significativamente maior nos grupos SHAM e OVX SM RIS em comparação com os grupos SH SM e OVX SM, todos com implantes funcionalizados com genisteína. Apesar de não observarmos diferenças estatísticas significativas, o grupo OVX SM RIS apresentou maior valor de torque de remoção do implante quando comprado com SHAM, ambos com implantes funcionalizados. Vale destacar que os melhores valores no torque de remoção foram observados no grupo OVX SM Ris associado à superfície genisteína e por este motivo, sugere-se que a associação entre risedronato sistêmico e genisteína local possibilitou uma melhora na biomecânica do tecido ósseo periimplantar na condição sistêmica de deficiência de estrógeno e síndrome metabólica.

No entanto, a superfície funcionalizada por genisteína isoladamente, sem a administração sistêmica de risedronato mostrou uma piora na biomecânica do tecido ósseo peri-implantar no grupo OVX SM. Este mesmo achado foi observado no grupo

SM que recebeu a funcionalização por genisteína. Coelho e cols [33] observaram redução significativa do torque de remoção dos implantes no grupo com síndrome metabólica quando comparado com o grupo controle, porém, o estudo analisou somente com interferência sistêmica a síndrome metabólica. No nosso estudo, não houve diferença estatística significativa na comparação dos valores de torque de remoção entre os grupos com implantes convencionais e implantes funcionalizados.

6 CONCLUSÃO

Portanto, dentro dos limites deste estudo podemos concluir que:

- A concentração de 100 μM da genisteína para a funcionalização dos discos de titânio manteve a viabilidade celular e resultados favoráveis quanto a genotoxicidade.
- A dieta de cafeteria e a ovariectomia bilateral mimetizam a síndrome metabólica e a predisposição para osteoporose por deficiência de esteroides gonadais.
- A ação sinérgica entre fármaco sistêmico (risedronato de sódio) e genisteína local mostrou-se bastante promissora para a melhora no processo de reparo periimplantar, principalmente no grupo SHAM e OVX SM RIS.

REFERÊNCIAS

1. Asafo-Adjei TA, Chen AJ, Najarzadeh A, Puleo DA (2016) Advances in controlled drug delivery for treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 14:226–238. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0321-4>
2. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Jamil NA, Ima-Nirwana S (2017) Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet in a rat model. *Biomed Pharmacother* 98:191-200. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.042>
3. Mazidi M, Kengne AP, Vatanparast H (2018) Association of dietary patterns of American adults with bone mineral density and fracture. *Public Health Nutr* 21:2417–2423. <https://doi.org/10.1017/S1368980018000939>
4. Lin HH, Huang CY, Hwang LC (2018) Association between metabolic syndrome and osteoporosis in Taiwanese middle-aged and elderly participants. *Arch Osteoporos* 13:48. <https://doi.org/10.1007/s11657-018-0467-z>
5. Loke SS, Chang HW, Li WC (2018) Association between metabolic syndrome and bone mineral density in a Taiwanese elderly population. *J Bone Miner Metab* 36:200–208. <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0826-7>
6. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S (2018) Effects of metabolic syndrome on bone mineral density, histomorphometry and remodelling markers in male rats. *PLoS ONE* 13:e0192416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192416>
7. Jiang L, Shen X, Wei L, Zhou Q, Gao Y (2017) Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-ct and histomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med* 46:398–404. <https://doi.org/10.1111/jop.12499>
8. Mendes KG, Theodoro H, Rodrigues AD, Olinto MTA (2012) Prevalência de síndrome metabólica e seus componentes na transição menopáusica: uma revisão sistemática. *Cad Saúde Pública* 28:1423-1437. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012000800002>

9. Hur S, Cho SH, Song BK, Cho BJ (2018) Effect of resistance exercise on serum osteoprotegerin levels and insulin resistance in middle-aged women with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 24:9385-9391. <https://doi.org/10.12659/MSM.911548>
10. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S (2018) Exploring the potential of tocotrienol from *Bixa orellana* as a single agent targeting metabolic syndrome and bone loss. *Bone* 116:8–21. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.07.003>
11. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S (2018) The effects of vitamin E from *Elaeis guineensis* (Oil Palm) in a rat model of bone loss due to metabolic syndrome. *Int J Environ Res Public Health* 15:1828. <https://doi.org/10.3390/ijerph15091828>
12. Alhazidou E, Pergialiotis V, Panagopoulos P, Chrelias C, Hatziaelaki E, Papantoniou N, Trakakis E (2018) The impact of the metabolic syndrome on bone mass density: a prospective case control study. *Horm Mol Biol Clin Investig* 33:20170053. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0053>
13. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG, Kim HR (1997) Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol* 49:897-902. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06132.x>
14. Khosla S, Amin S, Orwoll E (2008) Osteoporosis in men. *Endocr Rev* 29:441-464. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0002>
15. Trino LD, Bronze-Uhle ES, Ramachandran A, Lisboa-Filho PN, Mathew MT, George A (2018) Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. *J Mech Behav Biomed Mater* 81:26-38. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.02.024>
16. Trino LD, Dias LFG, Albano LGS, Bronze-Uhle ES, Rangel EC, Graeff CFO, Lisboa-Filho PN (2018) Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. *Ceramics Int* 44:4000-4008. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.11.195>
17. Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, Oliveira PT, Rosa AL (2008). Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol* 28:205-211. <https://doi.org/10.1002/jat.1271>

18. U. S. Food & Drug Administration (2020) International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process". www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance. Accessed 25 March 2021.
19. Andrade PD, Vasconcellos LM, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELS, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR (2015) Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: in vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 56:538-544. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.026>
20. Long JA, Evans HM (1922) The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. University of California Press, Berkeley.
21. Mo D, Hsieh P, Yu H, Zhou L, Gong J, Xu L, Liu P, Chen G, Chen Z, Deng Q (2018) Osteosarcopenic obesity and its relationship with dyslipidemia in women from different ethnic groups of China. *Arch Osteoporos* 13:65. <https://doi.org/10.1007/s11657-018-0481-1>
22. Naylor KE, Jacques RM, Paggiosi M, Gossiel F, Peel NFA, McCloskey EV, Walsh JS, Eastell R (2016) Response of bone turnover markers to three oral bisphosphonate therapies in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study. *Osteoporos Int* 27:21–31. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3145-7>
23. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D (2016) A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 167:382-391. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>
24. Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM (2013) Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 65:254-261. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022>
25. Camargo Reis Mello D, Rodrigues LM, D'Antola Mello FZ, Gonçalves TF, Ferreira B, Schneider SG, Oliveira LD, Vasconcellos LMR (2020) Biological and microbiological interactions of Ti-35Nb-7Zr alloy and its basic elements on bone

marrow stromal cells: good prospects for bone tissue engineering. *Int J Implant Dent.* 6:65. <https://doi.org/10.1186/s40729-020-00261-3>

26. Wang X, Chen W, Liu Q, Liu L (2020) Genistein adsorbed mesoporous bioactive glass with enhanced osteogenesis properties. *Biotechnol Lett* 42:321–328. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02773-4>

27. Khan AA, Morrison A, Kendler DL, et al (2017) Case-based review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. *J Clin Densitom* 20:8-24. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2016.09.005>

28. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 72:1938-1956. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>

29. Tükel HC, Delilbasi E (2019) Effects of metabolic syndrome on jawbones and bone metabolic markers in sucrose-fed rats. *Odontology* 107:457–464. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00422-w>

30. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S (2016) The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: a review. *Nutrients* 8:347. <https://doi.org/10.3390/nu8060347>.

31. Miao Q, Li JG, Miao S, Hu N, Zhang J, Zhang S, Xie YH, Wang JB, Wang SW (2012) The bone-protective effect of genistein in the animal model of bilateral ovariectomy: roles of phytoestrogens and PTH/PTHrP against post-menopausal osteoporosis. *Int J Mol Sci* 13:56-70. <https://doi.org/10.3390/ijms13010056>

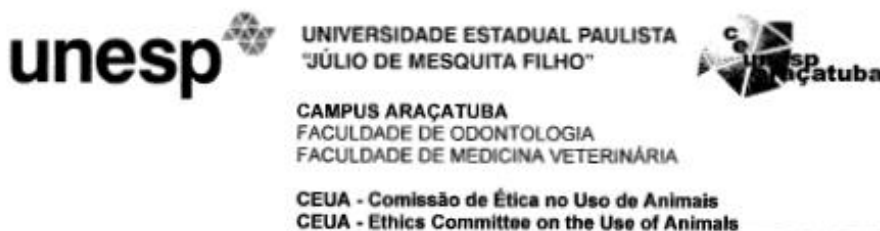
32. Coelho PG, Pippenger B, Tovar N, Koopmans SJ, Plana NM, Grave DT, Engbrechtson S, Van Beusekom HMM, Oliveira PGFP, Dard M (2018) Effect of obesity or metabolic syndrome and diabetes on osseointegration of dental implants in a miniature swine model: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 76:1677-1687. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.02.021>

33. Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Macari S, Pereira TSF, Diniz IMA, Andrade I Jr, Ferreira AVM, Silva TA (2018) High-refined carbohydrate diet promotes

detrimental effects on alveolar bone and femur microarchitecture. Arch Oral Biol 86:101-107. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.11.013>

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito sinérgico entre Risedronato sistêmico e Genisteína local sobre o reparo peri-implantar em ratas com deficiência de estrogênio e síndrome metabólica**", Processo FOA nº 00566-2019, 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 12 de Novembro de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 12 de Outubro de 2020.

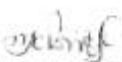
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 12 de Novembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the synergistic effect between systemic Risedronate and local genistein on peri-implant repair in estrogen deficient rats and metabolic syndrome**", Protocol FOA nº 00566-2019, 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 November 12, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 12, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 12, 2020.


Prof. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

ANEXO B - Revista proposta para publicação: Clinical Oral Investigations

<https://www.springer.com/journal/784/submission-guidelines>