

ANDERSON MAIKON DE SOUZA SANTOS

**Avaliação do Reparo Ósseo com Bio-Oss® Associado ao
Raloxifeno em Levantamento de Seio Maxilar de Coelhos**

ANDERSON MAIKON DE SOUZA SANTOS

**Avaliação do Reparo Ósseo com Bio-Oss® Associado ao
Raloxifeno em Levantamento de Seio Maxilar de Coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia 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 Buco-Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Associado Eduardo Hochuli Vieira

Coorientador: Dr. Rodrigo dos Santos Pereira

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237a Santos, Anderson Maikon de Souza.
Avaliação do reparo ósseo com Bio-Oss® associado
ao raloxifeno em levantamento de seio maxilar de
coelhos / Anderson Maikon de Souza Santos. –
Araçatuba, 2021.
48 f. : il.

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

1. Coelhos 2. Transplante ósseo 3. Otimização
4. Seio maxilar I. T.

Black D7
CDD 617.6

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo primeiramente a **Deus**, por me conceder a dádiva da vida e me iluminar para me manter firme nas batalhas da vida.

Aos meus pais, **José Joseilson dos Santos e Maria Ednalva de Souza Santos**, que sempre me derem apoio incondicional para seguir meus sonhos, por mais desafiadores que fossem. Serei eternamente grato e nem toda a vida será o bastante para devolver todo o carinho dado a mim.

Aos **meus familiares**, que de maneira direta ou indireta foram essenciais para o sucesso desta jornada.

AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor **Josuel Raimundo Cavalcante**, por ter acreditado no meu potencial e ter apoiado o meu sonho na Cirurgia Buco-maxilo-facial. Foi e segue como um grande exemplo de pessoa e profissional, além de um grande amigo que pretendo preservar por toda a vida.

Ao meu orientador, **Prof. Eduardo Hochuli Vieira**, pela honra de poder ser orientado por este expoente da Cirurgia Buco-maxilo-facial. Agradeço a paciência e ensinamentos neste período, e torço para que nossa parceria continue abençoada.

Ao **Prof. Leonardo Perez Faverani**, que desde meus primeiros dias em Araçatuba recebeu-me como um amigo e desde então não mede esforços para tornar nosso ambiente de trabalho o mais amigável possível. Agradeço a amizade e ensinamentos a mim direcionados.

Ao **Prof. Valthierre Nunes de Lima**, que é fonte de inspiração e referencial a ser seguido como pessoa e profissional. Agradeço por tanto conselhos e pela amizade que construímos.

À **Profª. Roberta Okamoto**, a senhora foi fundamental na minha formação. Sempre alegre e com boa vontade para tirar tantas dúvidas deste seu eterno aprendiz. Agradeço por toda ajuda e apoio.

À **Profª. Ana Paula Farnezi Bassi**, que sempre me direcionou no caminho certo e tanto me ajudou nesta caminhada. Agradeço o apoio e os ensinamentos.

Ao **Prof. Francisley Ávila Souza**, por todo o acolhimento e suporte nesse período. Que Deus possa sempre lhe manter como esta pessoa carinhosa e acolhedora, que torna os dias dos seus alunos mais alegres e alivia a saudade de casa.

Ao **Prof. Osvaldo Magro Filho**, pela oportunidade de aprender tanto sobre a cirurgia ortognática como este profissional de qualidade ímpar. Agradeço os ensinamentos e a amizade que construímos.

Ao **Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, pela honra de desfrutar dos seus conhecimentos. Mesmo em meio a tantas obrigações, sempre se fez presente na minha formação.

À **Profª. Daniela Ponzoni**, que com seu jeito calmo e acolhedor sempre me ajudou nesta jornada. Agradeço o acolhimento e oportunidade de aprendizado.

À **Profª. Alessandra Marcondes Aranega**, que me mostrou que o trabalho, quando feito com amor, é sempre maravilhoso.

Ao **Prof. André Luis da Silva Fabris**, agradeço a amizade e acolhimento. Sua participação foi essencial para minha formação pessoal e profissional.

Aos demais **professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA Unesp** – que contribuíram direta ou indiretamente nesta jornada.

Ao **Prof. Paulo Noronha de Lisboa Filho**, agradeço a parceria e colaboração na realização do presente estudo. Agradeço a cordialidade e disponibilidade.

Ao **Tiburtino José de Lima Neto (Tibu)**, um amigo que desde a residência me ajuda e me orienta. Só tenho a agradecer pela amizade e companheirismo durante toda essa nossa jornada. Que Deus possa abençoar essa amizade e faça-nos alcançar o sucesso que desejamos. Sou muito grato pela nossa amizade.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Bruno Coelho Mendes, Cristian Statkievcz, Eduardo Dallazen, Gustavo Momesso, Willian Phillip, Matheus Paveslki, Vinicius Bizelli, Leonardo Delanora, Barbara Rios, Lara Esteves, Ana Vasques, Natalia Machado, Kim Henderson, Nathalia Siqueira, Jaqueline Hassumi, Letícia Pitol**. Vocês foram minha família nos últimos anos, torço para que os laços de amizade desse período possam durar pela vida toda.

Aos **parceiros da Iniciação Científica**, os quais não ousarei citar para não esquecer nenhum. Vocês foram parte fundamental para o desenvolvimento desse trabalho, bem como para o meu desenvolvimento pessoal. Muito obrigado por todo o apoio, sem vocês nada disso seria possível.

Aos demais **amigos de pós-graduação**, que tanto me ajudaram e me orientaram por diversas vezes. Meu sincero agradecimento por tudo que foi feito. Peço que Deus vos abençoe para que a vossa jornada seja um sucesso.

Ao **João Correa (Seu João)**, por tantas conversas descontraídas e por toda a ajuda no manejo dos animais.

À **Dona Fátima**, pelo carinho de sempre e claro, pelo café quente que ajudou de mais para me manter alerta e firme na luta do dia a dia.

Aos funcionários do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Marco Ianner, Paulo Gratão, Renato Oliveira e Fausto Canuto**. Através desses estendo meu agradecimento a todos os funcionários desta maravilhosa instituição (FOA – Unesp), que sempre me receberam com carinho e me ajudaram incansavelmente.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, por ter sido minha casa nos últimos dois anos e pela oportunidade de poder carregar o brasão desta instituição histórica e fundamental para a Cirurgia Buco-maxilo-facial.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia desta faculdade, que na pessoa do seu coordenador, o Prof. André Luiz Fraga Briso, não mede esforços para manter esta faculdade no seu patamar de direito. Aproveito para estender meus agradecimentos às funcionárias desta pós-graduação, **Cristiane Regina Lui Matos, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Lilian Sayuri Mada.**

Aos **funcionários e colaboradores** das instituições parceiras (Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Hospital da Unimed Araçatuba, Hospital da Unimed Birigui e NEC).

À **vida dos animais** utilizados nos experimentos, sem eles este trabalho não seria nada.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – pelo acreditar nos pesquisadores brasileiros e me incentivar por meio de bolsa de estudo, Código de Financiamento 001.

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança”

Stephen Hawking

Santos AMS. Avaliação do reparo ósseo com Bio-Oss® associado ao raloxifeno em levantamento de seio maxilar de coelhos (dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp); 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o potencial do Bio-oss® otimizado pelo processamento ultrassônico e associação com o raloxifeno no reparo ósseo em aumento de seio maxilar de coelhos. A associação dos materiais pesquisados foi realizada pelo processamento ultrassônico com 80% de Bio-oss e 20% de Raloxifeno. Para tanto, 8 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, 6 meses de idade foram submetidos ao levantamento de membrana do seio maxilar bilateralmente, em seguida os seios maxilares foram preenchidos pelos biomateriais, de acordo com o grupo experimental, sendo 4 animais (8 seios) por grupo: grupo 1 (BS) foi realizada a aplicação do Bio-oss submetido ao processamento ultrassônico sem raloxifeno, nos dois seios. O grupo 2 (BR) foi realizada a aplicação do Bio-oss com processamento ultrassônico juntamente ao raloxifeno, nos dois seios. Foi realizada eutanásia de 2 animais de cada grupo após 2 semanas da enxertia, para análise histométrica de osso neoformado, tecido conjuntivo e material remanescente, e para as reações de imunoistoquímica através do anticorpo primário contra Runx2. Já com 6 semanas, os outros 2 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia para avaliação de parâmetros histométricos (HE) e imunohistoquímicos para OCN, OPG, RANKK-L e TRAP. Os resultados obtidos mostraram superioridade para o grupo BS, que apresentou mais organização tecidual no período de 14 dias, além de maior quantidade de tecido ósseo neoformado aos 14 e 42 dias ($p < 0,05$). A avaliação imunoistoquímica revelou similaridade entre os escores para ambos os grupos, independente do tempo e proteína analisada. Conclui-se que a adição do raloxifeno, pelo processamento ultrassônico, aumentou reduzindo a quantidade de osso neoformado.

Palavras-chave: Coelhos. Transplante ósseo. Otimização. Seio maxilar.

Santos AMS. **Evaluation of bone repair with Bio-Oss® associated with raloxifene in rabbit maxillary sinus lifting** (dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp); 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the potential of Bio-oss® optimized by the ultrasonic process and association with raloxifene in bone repair in rabbit maxillary sinus augmentation. The association of the researched materials was carried out by the ultrasonic process with 80% Bio-oss and 20% Raloxifene. Eight male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), six-months of age were subjected to a bilateral maxillary sinus lifting and, they were filled with biomaterials according to two groups, with four animals (eight maxillary sinus) per group: group 1 (BS) Bio-oss was subjected to ultrasonic process without raloxifene in both sinuses. Group 2 (BR) performed the application of the Bio-oss subjected to ultrasonic process together with raloxifene in both sinuses. The euthanasia of two animals for each group was performed two weeks after grafting, for histometric analysis of newly formed bone, connective tissue, and remaining material, and for immunohistochemical reactions using the primary antibody against Runx2. At 6 weeks, the other two animals for each group were euthanized to evaluate histomorphometric (HE), and immunohistochemical parameters for OCN, OPG, RANK -L, and TRAP. The results obtained showed superiority for the BS group, which presented more tissue organization in the period of 14 days, in addition to a greater amount of new bone tissue at 14-, and 42- days ($P<0.05$). The immunohistochemical evaluation revealed a similarity between the scores for both groups, regardless of the time and protein analyzed. It is concluded that the addition of raloxifene, through the ultrasonic process, increases the inflammatory process in the initial period, reducing bone repair.

Keywords: Rabbits. Bone transplantation. Optimization. Maxillary sinus.

LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos grupos de estudos	24
FIGURA 2 – Esquema de procedimento cirúrgico. A: Local para realização de janela de acesso aos seios (círculos) com distância de 2 cm anterior a sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente a linha média (setas azuis). B e C: esquema de plano coronal (b em A) e sagital (c em A), respectivamente, ilustrando área a ser enxertada (estrelas)	26
FIGURA 3 - Delineamento experimental. Dois animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia no período de 2 e 6 semanas, passaram por análise histométrica e Imunoistoquímica.	26
FIGURA 4 - Esquema de processamento laboratorial das peças para montagem de lâminas. Fixação com formol a 10%, descalcificação com EDTA, desidratação em sequência de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para montagem de lâminas.	27
FIGURA 5 – Imagens histológicas representativas de 2 semanas	31
FIGURA 6 – Imagem representativa para marcação de Runx2	32
FIGURA 7 – Imagens histológicas representativas de 6 semanas	34
FIGURA 8 – Imagem representativa para marcação de OC	35
FIGURA 9 - Imagem representativa para marcação de OPG	36
FIGURA 10 - Imagem representativa para marcação de RANK-L	37
FIGURA 11 – Imagem representativa para marcação de TRAP	37

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Dados histométricos de área de osso neoformado (AON), tecido conjuntivo (CONJ) e biomaterial remanescente (BIOM) para os grupos BR e BS no período de 2 semanas	30
GRÁFICO 2 – Dados histométricos de área de osso neoformado (AON), tecido conjuntivo (CONJ) e biomaterial remanescente (BIOM) para os grupos BR e BS no período de 6 semanas	33

LISTA DE ABREVIATURAS

BR Bio-oss® submetido ao processamento ultrassônico juntamente ao raloxifeno na proporção de 80% para 20%

BS Bio-oss® submetido ao processamento ultrassônico

EDTA Ácido etileno tetra-acético

HE Hematoxilina e Eosina

OC Osteocalcina

OPG Osteoprotegerina

RANK-L Receptor do fator nuclear Kappa B - Ligante

TRAP Fosfatase ácida resistente ao tartarato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Preparo do Biomaterial	23
2.1.1 Processamento por Ultrassônico	23
2.2 Trabalho em coelhos	23
2.2.1 Procedimento cirúrgico	24
2.3 Análises dos trabalhos clínico e experimental	26
2.3.1 Análise Histométrica	26
2.3.2 Análise Imunoistoquímica	27
2.4 Análise Estatística	28
3 RESULTADOS	30
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	48

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação na região posterior de maxila é frequentemente limitada pela pneumatização do seio maxilar, que acaba reduzindo a quantidade de tecido ósseo disponível para ancoragem de implantes dentários. Diante disto diferentes técnicas de elevação de seio maxilar vêm sendo descritas para aplicação de enxertos ósseo e instalação de implantes nestas áreas (1-3).

O osso autógeno é visto como o enxerto de maior previsibilidade por ser osteogênico, osteoindutor e osteocondutor.(4) Todavia para aquisição deste enxerto é necessária uma segunda cirurgia para remoção dele. Esta remoção apresenta diversas complicações associadas, como edema, infecção e dor, que irão variar em frequência e intensidade a depender, dentre outros fatores, da área doadora (4, 5).

Embora o enxerto autógeno se destaque por suas propriedades, cada vez mais materiais vêm sendo desenvolvidos na busca por substitutos ósseos que tenham resultados semelhantes a esse. Neste contexto, o Bio-oss[®] vem apresentando resultados satisfatórios em diferentes modelos de estudo(6, 7), sendo um dos biomateriais, para enxertia óssea, mais difundidos e estudados mundialmente.

O Bio-oss[®] é produzido por meio da remoção dos componentes orgânicos do osso bovino, tendo propriedades comparáveis à matriz do osso humano, proporcionando um arcabouço para a migração de células osteogênicas do leito receptor por meio de sua macro e microestrutura com sistema de poros interconectados (osteocondução) (8).

A associação do Bio-oss[®] com osso autógeno é proposta como opção para otimizar a formação óssea relacionada ao Bio-oss[®] e reduzir a quantidade de osso autógeno necessário para a correção do defeito ósseo, reduzindo assim a morbidade ligada à remoção deste enxerto (6). Todavia, a associação de osso autógeno a biomateriais não tem mostrado otimização da quantidade osso neoformado, em levantamento de seio maxilar (9-14).

Na busca por um substituto ósseo otimizado, que apresente osteoindução além da propriedade osteocondutora, já observada no diversos substitutos comercializados atualmente, a associação de proteínas que agem no metabolismo e reparo ósseo, como a rhBMP-2, rhVEGF (15, 16) e mais recentemente, a associação de medicações como do Raloxifeno tem se mostrado uma alternativa para melhoria desses biomateriais (17).

O raloxifeno, um derivado do benzotiofeno não-esteroidal, é a segunda geração de SERM, que são moduladores seletivos de receptores de estrógeno (18). Que por sua vez, foram liberados pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de osteoporose e para a redução do risco de câncer de mama em 1998 e 2007, respectivamente (19).

O raloxifeno, atua na osteogênese, estimulando células pré-osteoblásticas e promovendo a mineralização da matriz extracelular óssea, agindo na via canônica WNT/B-catenina e Runx-2 (Runt-related transcription factor 2), aumentando a expressão de osteocalcina (proteína relacionada à mineralização óssea), colaborando no reparo ósseo, aumentando seu volume e diminuindo a porosidade (20).

O trabalho de Ramalho-Ferreira e colaboradores (2015)(21), bem como o de Faverani *et al.* (22) e Yogui *et al.* (20), observaram, por meio de diversas análises, que a administração sistêmica de raloxifeno favorece o reparo ósseo peri-implantar em ratas osteoporóticas, sendo por vezes, semelhante aos resultados de ratas não osteoporóticas. Além disso, o tratamento com raloxifeno também otimiza o reparo ósseo alveolar(23, 24).

Embora seja de conhecimento geral que o uso sistêmico desta droga pode aumentar o risco de tromboembolismo pulmonar e venoso, como já foi observado por Adomaityte *et al.* (25) e reforçado, em 2018, pelas diretrizes do Colégio Médico Americano de Osteoporose (26), outros pesquisadores observaram que esta tendência não se aplica à população em geral (27). Além disso, não foram encontrados estudos que tenham observado a repercussão sistêmica da administração local desta medicação.

Lisboa-Filho e colaboradores (17) realizaram o primeiro e único estudo com aplicação do raloxifeno e associação a um biomaterial (BioGran[®]) por meio do processamento ultrassônico, onde mostrou resultados de reparo ósseo satisfatórios, mas semelhantes àqueles do biomaterial sem o raloxifeno, no entanto, o estudo avaliou o reparo ósseo apenas pela análise de microtomografia computadorizada, sem avaliação de parâmetros histológicos ou de dinâmica da neoformação, que são fundamentais para a completa avaliação do reparo ósseo. Além disso, ainda não foram realizados estudos da aplicação do raloxifeno associado a biomateriais, e nem de biomateriais submetidos ao processamento ultrassônico em elevação de seios maxilares.

Embora o Bio-oss[®] apresente desempenho clínico de destaque frente aos demais substitutos ósseos disponíveis no mercado, ele ainda é limitado por apresentar apenas

propriedade de osteocondução, de maneira que a incorporação do raloxifeno pode fortalecer ainda mais este biomaterial como uma alternativa ao uso de osso autógeno no reparo ósseo.

Diante desta problemática, objetivou-se realizar a funcionalização do Bio-oss[®] com o raloxifeno, por meio do processamento ultrassônico, buscando desenvolver um enxerto que otimize o reparo ósseo em cirurgias de elevação da membrana de seio maxilar de coelho.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do Biomaterial

O processamento para associação do Bio-oss® com o Raloxifeno, bem como a avaliação da taxa de liberação do medicamento foram realizados no Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Bauru, através de colaboração e supervisão do professor Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho.

2.1.1 Processamento por ultrassônico

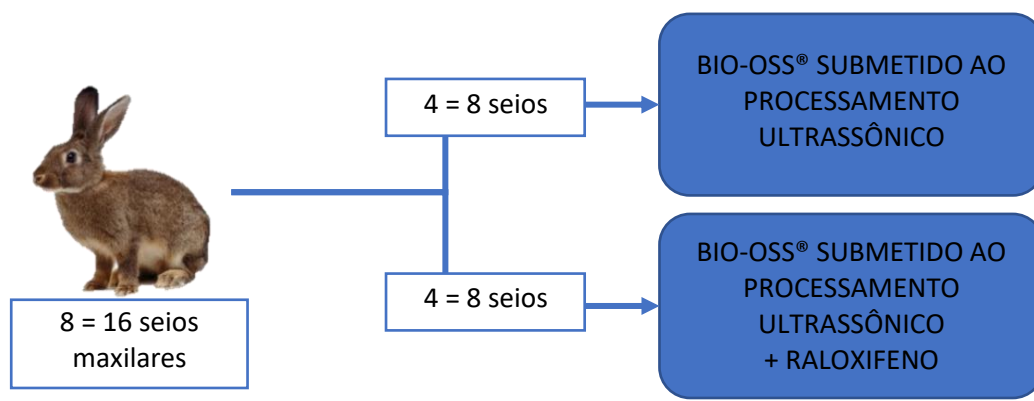
Os biomateriais utilizados para este estudo foram Bio-oss® e Raloxifeno, ambos em estado sólido. A associação entre estes (80% de Bio-oss® e 20% de Raloxifeno) foi realizada pelo processamento ultrassônico, por meio do Sonics® VCX-750 (Sonics & Materials, Inc., USA) por 15 minutos, utilizando 750 W de potência e frequência de 20kHz, com até 40% de amplitude variável do equipamento, o Bio-oss® também foi submetido ao processamento isoladamente, como grupo controle. A água Ultra-pura Milli-Q® (Millipore, USA) foi utilizada como meio para obter mistura homogênea e redução das partículas, baseando em estudo prévio de Lisboa-Filho *et al.* (17), e Gomes-Ferreira *et al.* (28).

2.2 Trabalho em coelhos

Para realização deste trabalho foram utilizados 8 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus* – Linhagem Botucatu) com cerca de 6 meses de idade e peso corporal de 3 a 4 kg provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Botucatu, onde cada coelho teve os dois seios maxilares preenchidos por biomaterial (Fig. 1). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (nº 350-2019), e seguiu o ARRIVE GUIDELINE sugerido por Kilkenny *et al.* (29). Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, alimentados com ração própria e água corrente no período pré e pós-operatório, no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. O número de animais a serem estudados em cada grupo foi determinado pelo *power test* realizado no website <http://www.lee.dante.br> baseado em estudo prévio (30). A diferença na média a ser detectada foi de 17.9, com desvio padrão de 10.1, o nível de significância adotado foi de 5%, o poder do teste foi atribuído à 80% e

conduzido na forma monocaudal, atingindo um “n” de 4 seios por grupo por tempo. Assim, os grupos a serem estudados no presente estudo foram determinados conforme exposto na figura 1.

FIGURA 1 - Distribuição dos grupos de estudos



Fonte: Autor, 2021

2.2.1 Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os 8 animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia geral foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na linha mediana do dorso nasal.

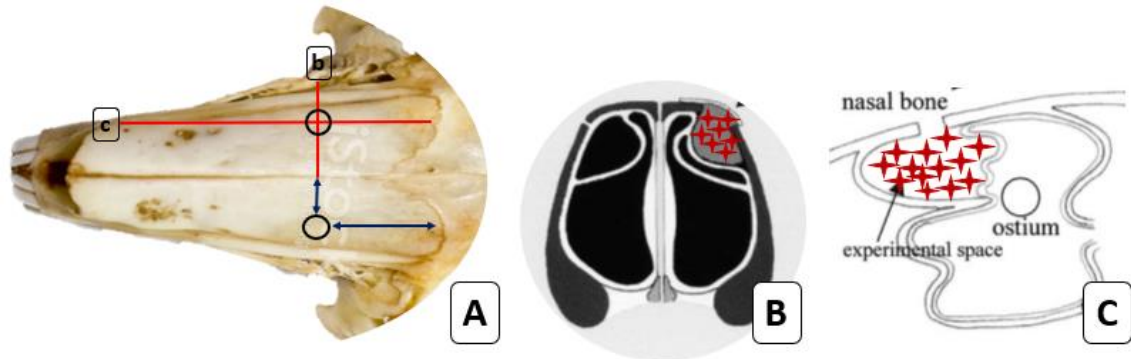
Após prévia tricotomia e antisepsia pré-operatória no dorso nasal por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), o osso nasal foi acessado. O protocolo cirúrgico utilizado para o acesso a cavidade sinusal do animal foi o estabelecido por Asai, Shimizu e Ooya (31).

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C, montada em cabo de bisturi número 3, uma incisão linear de 5 cm foi feita na linha mediana do dorso nasal. A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt o suficiente para a exposição do osso nasal e a da sutura nasoincisa. Após exposição, uma

janela circular de 5 mm de diâmetro foi confeccionada bilateralmente a linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 2 cm anterior a sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente a linha média. Este procedimento foi realizado sobre abundante irrigação com solução salina fisiológica estéril a 0.9%, com a utilização de uma broca trefina de 3 mm de diâmetro para a demarcação da área e uma broca diamantada esférica nº 1011 para a finalização das osteotomias, ambas montada em contra-ângulo redutor de 20:1, que por sua vez estava conectado a um motor elétrico com rotação controlada a uma velocidade de 1500 rpm. Em cada seio maxilar, a membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais para garantir que sua integridade física seja mantida. Os enxertos foram acondicionados nos leitos cirúrgicos seguido do reposicionamento do retalho, que foi suturado com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos simples (Fig. 2). No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Enrofloxacin na dosagem de 8UI/Kg, Doxíciclina na dosagem de 5UI/kg e de Cloridrato de Tramadol na dosagem de 3UI/Kg/dia, sendo a primeira dose no pós-operatório imediato e as demais nos 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, até a eutanásia, após 2 e 6 semanas de pós-operatório.

O mesmo protocolo de sedação e anestesia foi aplicado seguido da eutanásia através da perfusão intracardíaca de soro fisiológico a 0,9% e formaldeído 4% com bomba perfusora peristáltica.

FIGURA 2 - Esquema de procedimento cirúrgico. A: Local para realização de janela de acesso aos seios (círculos) com distância de 2 cm anterior a sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente a linha média (setas azuis). B e C: esquema de plano coronal (b em A) e sagital (c em A), respectivamente, ilustrando área a ser enxertada (estrelas)

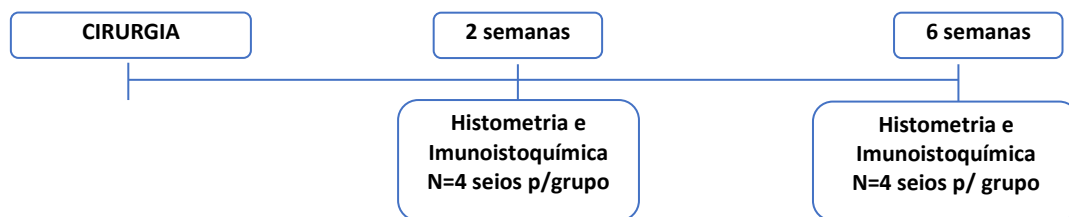


Fonte: Adaptado de Asai, Shimizu e Ooya, 2002²⁷

2.3 Análise do trabalho experimental

A eutanásia foi realizada às 2 e 6 semanas, e após dissecação, o complexo nasal, incluindo o nariz e os seios maxilares, foram submetidos a diferentes análises para caracterização da arquitetura óssea (Fig. 3).

FIGURA 3 - Delineamento experimental. Dois animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia no período de 2 e 6 semanas, passaram por análise histométrica e Imunoistoquímica.



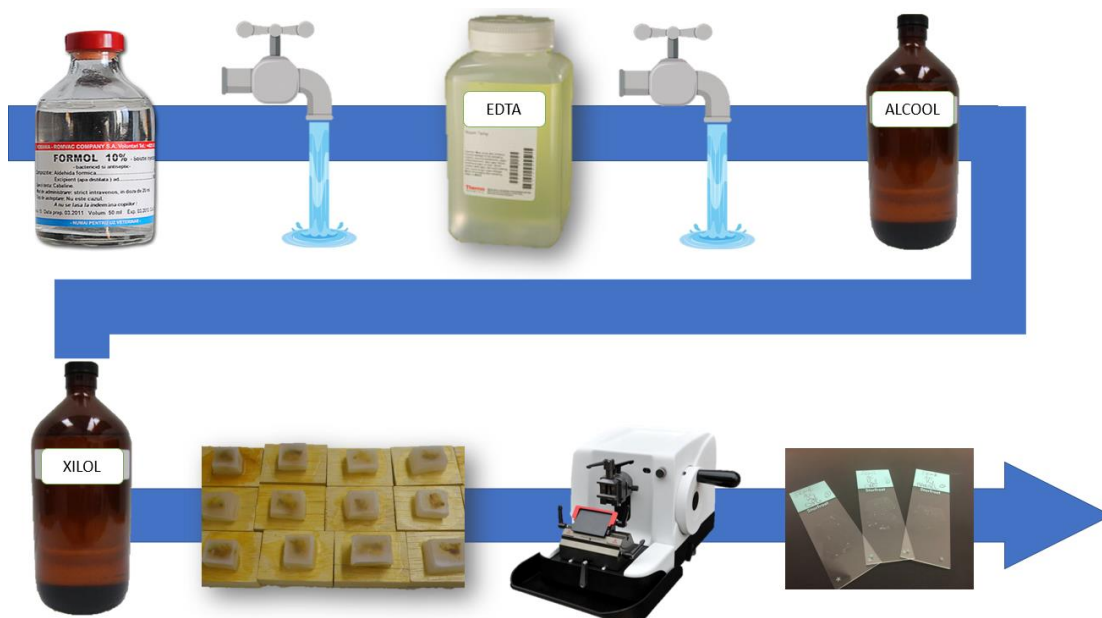
Fonte: Autor, 2021

2.3.1 Análise Histométrica

Após 2 semanas da cirurgia, os blocos individuais contendo a região do complexo nasal de 2 coelhos foram coletados e fixados em uma solução de formalina a 10%. Após 48 horas, os 4 seios foram lavados por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA, trocadas semanalmente. A seguir, as amostras passaram por processo laboratorial para inclusão em parafina e foram cortadas com 5 µm de espessura para serem dispostas em lâminas histológicas e posteriormente coradas em hematoxilina & eosina (Fig. 4). As imagens foram obtidas com

uma câmera digital (JVC TK1270 Color Video Câmera) acoplada ao microscópio, em objetiva de 12,5x e analisadas por meio da grade de Merz (32). As imagens, com a grade anexada, foram montadas no programa PowerPoint para Windows (Microsoft®) onde foram contados os pontos referentes a serem analisados para, enfim, obter o percentual de osso neoformado, de tecido conjuntivo e biomaterial remanescente da amostra, tanto no período de 2 quanto de 6 semanas após a cirurgia.

FIGURA 4 - Esquema de processamento laboratorial das peças para montagem de lâminas. Fixação com formol a 10%, descalcificação com EDTA, desidratação em sequência de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para montagem de lâminas.



Fonte: Autor, 2021

2.3.2 Análise Imunoistoquímica

- 2 semanas (Runx-2)

Para este momento foi realizada imunomarcagem para a proteína Runx-2, que é responsável por regular os genes que executam o processo de formação óssea e a diferenciação dos osteoblastos (33).

- **6 Semanas (OC, OPG, RANK-L e TRAP)**

Para este tempo experimental foi realizada imunomarcações para OC (Osteocalcina), que é uma proteína associada à mineralização do osso e sua expressão indica maturação deste (34, 35); OPG (Osteoprotegerina)/RANK-L (Receptor of nuclear factor Kappa B-Ligant), que sinalizam o processo de turnover ósseo; e para TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), que é responsável pela marcação dos osteoclastos na superfície óssea, indica o processo de remodelação óssea (36).

Para o processamento imunoistoquímico foram utilizados anticorpos primários policlonais produzidos em cabras contra Runx2 (Goat anti-Runx2 - Santa Cruz Biotechnology, SC8566), OC (Goat anti-OC - Santa Cruz Biotechnology, SC18319), OPG (Goat anti-OPG - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), Rank-L (Goat anti-Rank-L - Santa Cruz Biotechnology, SC7627) e, TRAP (Goat anti-trap - Santa Cruz Biotechnology, SC30832).

Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos contra IgG de cabra biotinizado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo). Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão.

O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente como relatado por Dos Santos Pereira *et al.* (37) por um único observador, previamente calibrado, atribuindo-se os *scores* 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas.

2.4 Análise Estatística

Após aplicação do teste de Shpiro-Wilk e constatação de normalidade dos dados, a análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA em dois fatores (tempo e grupo), sendo aplicado o pós-teste de Holm-Sidak para os dados histométricos. Todos os testes foram realizados no software SigmaPlot® 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA), sendo considerado um $p \leq 0,05$ como diferença estatisticamente significante.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

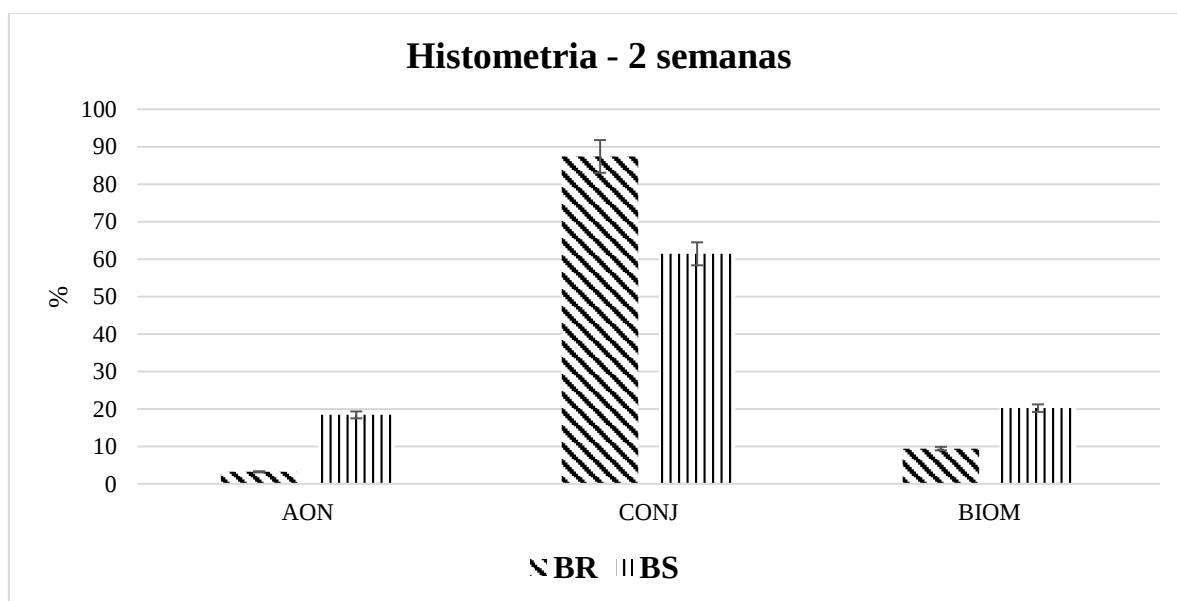
- 2 semanas

Análise Histométrica

O grupo BS apresentou maior quantidade de osso neoformado, com melhor organização tecidual e menor quantidade de infiltrado inflamatório. Havia ainda discretas regiões de osso imaturo e regiões de biomaterial remanescente, com tecido conjuntivo ricamente celularizado apresentando rica neovascularização e importante quantidade de osteoblastos, principalmente na periferia da área enxertada. Já o grupo BR apresentou amplo infiltrado inflamatório, com discretas áreas de osso neoformado, ainda imaturo, com pouca angiogênese e tecido conjuntivo menos organizado (Fig. 5).

A maior média de porcentagem de osso neoformado foi encontrado no grupo BS, com $18,4\% \pm 7,9$, enquanto o grupo BR apresentava $3,4\% \pm 3,1$ ($p < 0,001$). Quanto à presença de tecido conjuntivo o grupo BR obteve $87,4\% \pm 4,3$, e o grupo BS apresentou $61,4\% \pm 6,2$ ($p < 0,001$). Já para a área de biomaterial remanescente foi encontrada uma porcentagem de $9,4 \pm 3$ para o grupo BR, e de $20,2 \pm 5,6$ para o grupo BS ($p = 0,012$) (gráfico 1).

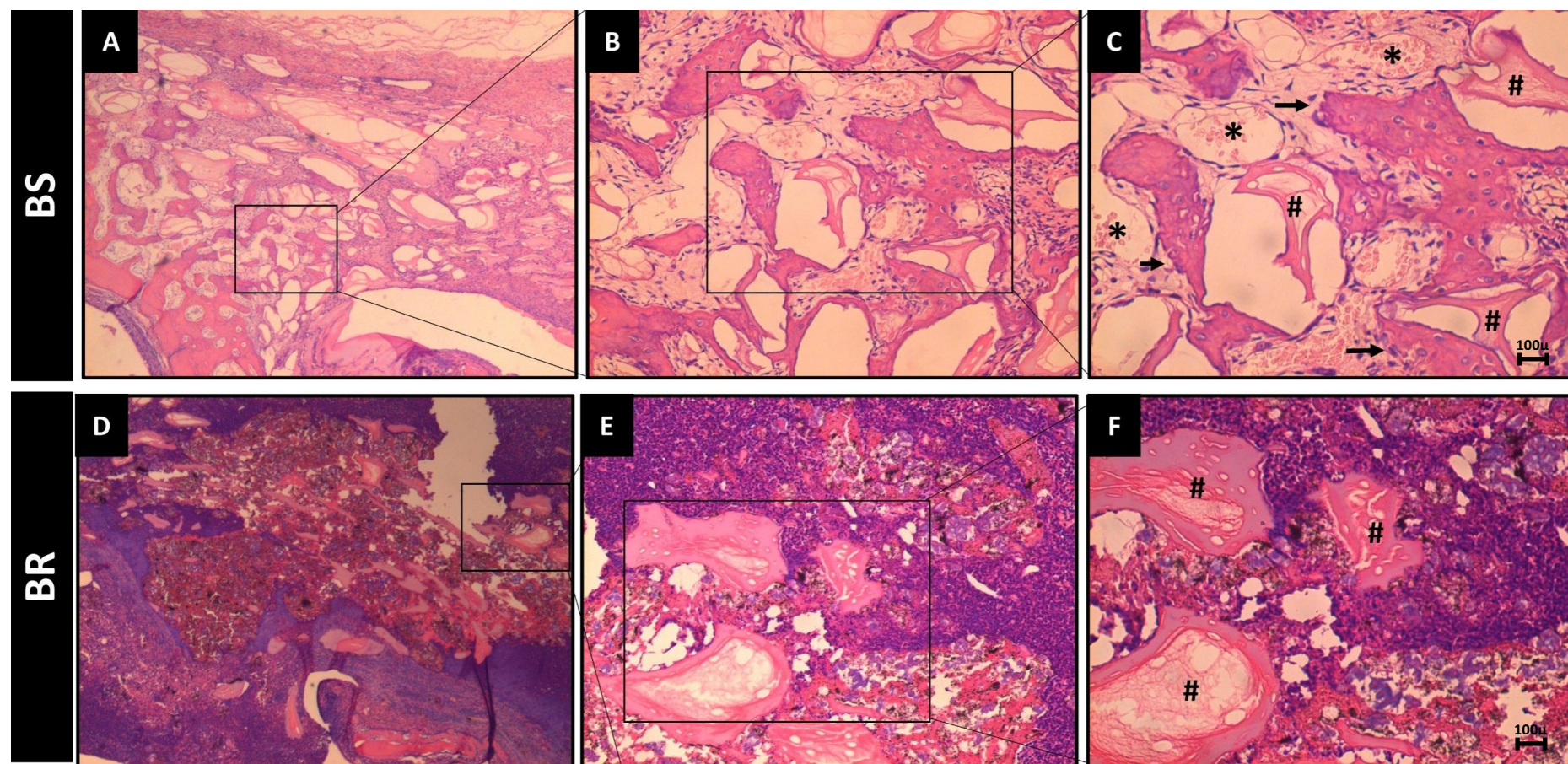
GRÁFICO 1 – Dados histométricos de área de osso neoformado (AON), tecido conjuntivo (CONJ) e biomaterial remanescente (BIOM) para os grupos BR e BS às 2 semanas.



Os grupos mostraram diferença estatística para os três parâmetros avaliados ($p < 0,05$)

Fonte: Autor, 2021

FIGURA 5 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 2 semanas. Coloração em hematoxilina e eosina. A Área de osso neoformado (seta), biomaterial remanescente (#) e tecido conjuntivo podem ser observadas nas imagens, além disso chama-se atenção para a angiogênese (*) e quantidade importante de osteoblastos no grupo BS (C). Enquanto o grupo BR é predominantemente composto por tecido inflamatório.

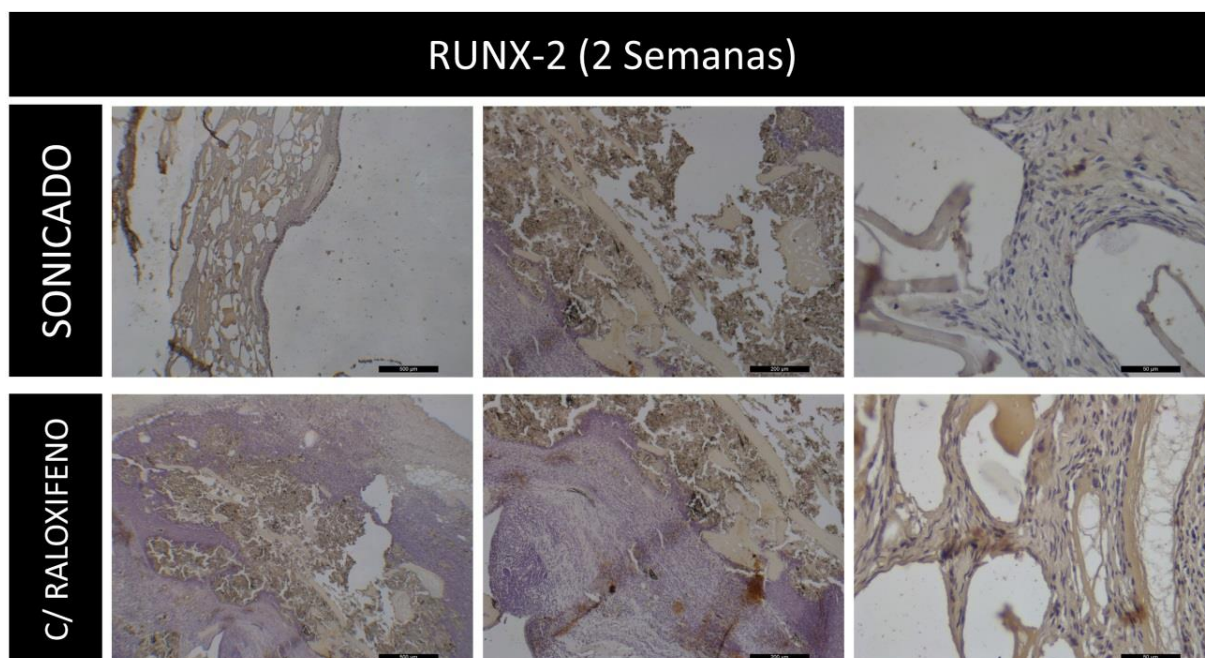


Fonte: Autor, 2021

Análise Imunoistoquímica

Às duas semanas foi avaliada a expressão do fator de transcrição RUNX2, que participa do processo de diferenciação osteoblástica. A presença deste fator de transcrição caracteriza a presença de osteoblastos jovens, resultantes da constante renovação destas células no leito reparacional. Foi observada marcação positiva para ambos os grupos, mas com score 1 para o grupo BS e score 2 para o grupo BR (Fig. 6). Vale destacar que a presença deste marcador foi observada no tecido conjuntivo que está presente no sítio reparacional.

FIGURA 6 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 2 semanas. Marcação Imunoistoquímica para Runx2.



Fonte: Autor, 2021

- 6 semanas

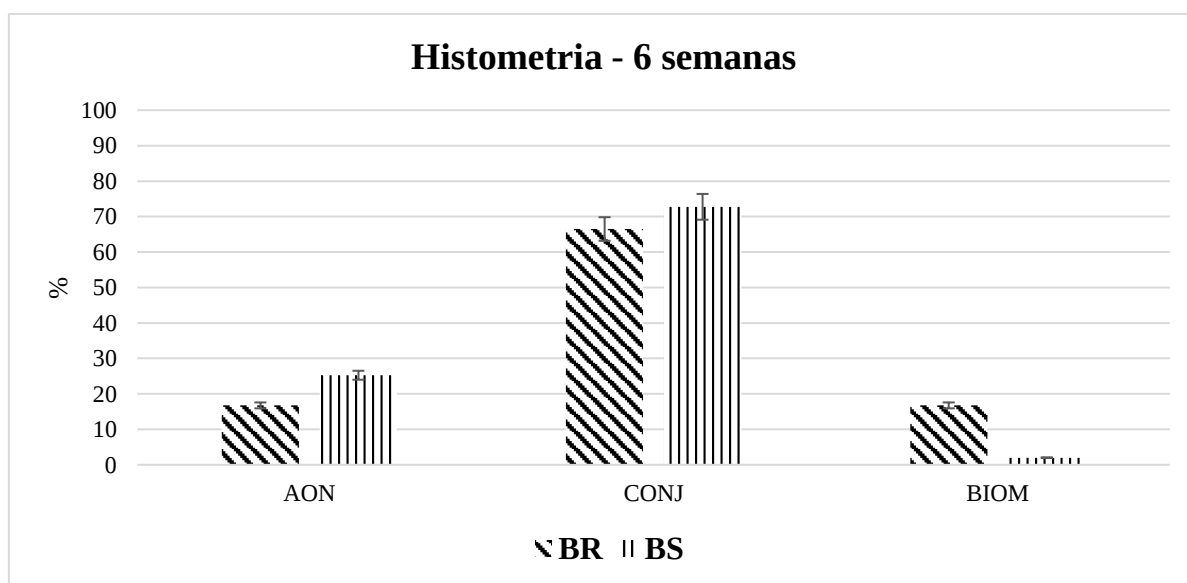
Análise Histométrica

O grupo BS apresentou maior quantidade de osso neoformado, com trabéculas bem formadas e tecido ósseo maduro. Além de ser observada maior formação óssea nas áreas de leito e ápice. A presença de tecido conjuntivo adiposo e vasos sanguíneos entre as trabéculas completa a imagem histológica (Fig. 7).

O grupo BR seguiu com importante infiltrado inflamatório na região central do seio, com áreas de osso neoformado, principalmente na região apical, ainda sendo encontrada grande quantidade de biomaterial remanescente (Fig. 7).

A maior média de porcentagem de osso neoformado foi encontrado no grupo BS, com $25,5\% \pm 4,1$, enquanto o grupo BR apresentava $16,7\% \pm 7,2$ ($p < 0,001$). Quanto à presença de tecido conjuntivo o grupo BR obteve $66,5\% \pm 3,4$, e o grupo BS apresentou $72,7\% \pm 4,1$, não havendo diferença estatística ($p = 0,084$). Já para a área de biomaterial remanescente foi encontrada uma porcentagem de $16,7 \pm 10,2$ para o grupo BR, e de $2,3 \pm 2,1$ para o grupo BS ($p = 0,003$) (gráfico 2).

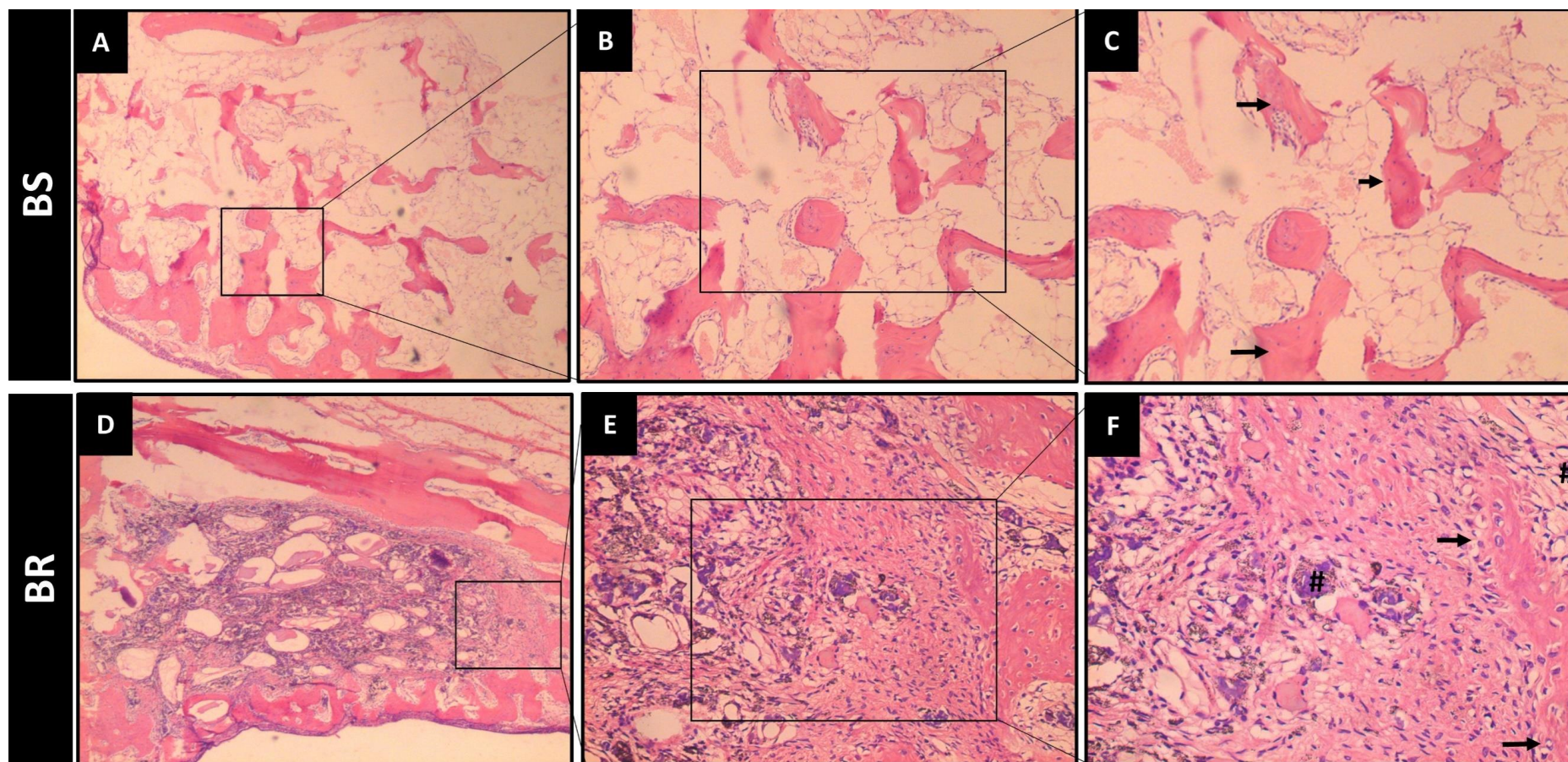
GRÁFICO 2 – Dados histométricos de área de osso neoformado (AON), tecido conjuntivo (CONJ) e biomaterial remanescente (BIOM) para os grupos BR e BS às 6 semanas.



O grupo BS mostrou superioridade quanto à AON ($p < 0,001$). Os grupos foram similares quanto à presença de tecido conjuntivo ($p = 0,084$). O grupo BR apresentou maior quantidade de biomaterial remanescente ($p = 0,003$).

Fonte: Autor, 2021

FIGURA 7 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 6 semanas. Coloração em hematoxilina e eosina. A Área de osso neoformado (seta), biomaterial remanescente (#) e tecido conjuntivo podem ser observadas nas imagens.



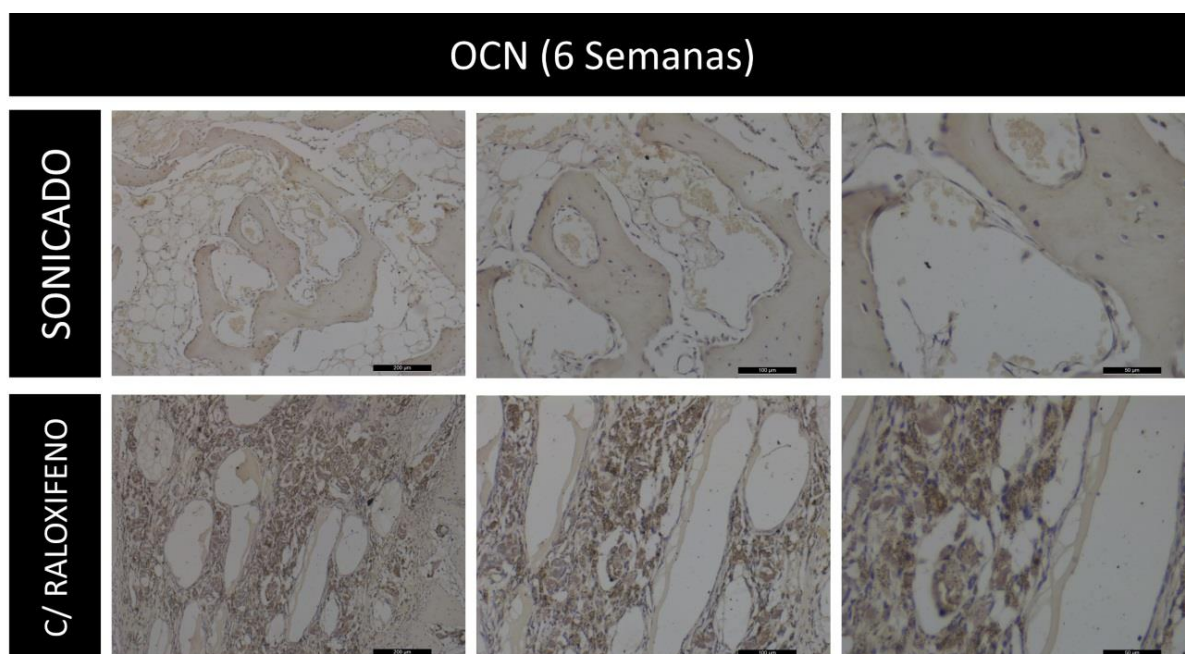
Fonte: Autor, 2021

Análise Imunoistoquímica

A imunomarcção foi realizada para as proteínas OCN, OPG, RANK-L e TRAP, a fim de avaliar a mineralização e a dinâmica do tecido ósseo. Foi observada marcação positiva para todas as proteínas em ambos os grupos.

A imunomarcção de OCN apresentou score 1 para o grupo BS e score 2 para o grupo BR (Fig. 7). A OCN, uma proteína não colágena que é classificada como marcadora da mineralização óssea. Sua presença sinaliza osteoblastos desenvolvidos e em atividade de mineralização sobre a matriz colágena. No grupo BS, observou-se uma discreta marcação para osteocalcina tanto em osteócitos como também em células de revestimento, mostrando a maturidade do tecido ósseo reparacional. No grupo raloxifeno, foi possível observar uma moderada marcação para osteocalcina nas células da linhagem osteoblástica, presentes no sítio reparacional. Nota-se também a presença de macrófagos no sítio reparacional. A presença de macrófagos pode estar relacionada a uma resposta inflamatória provocada pela presença do biomaterial introduzido no seio maxilar dos animais.

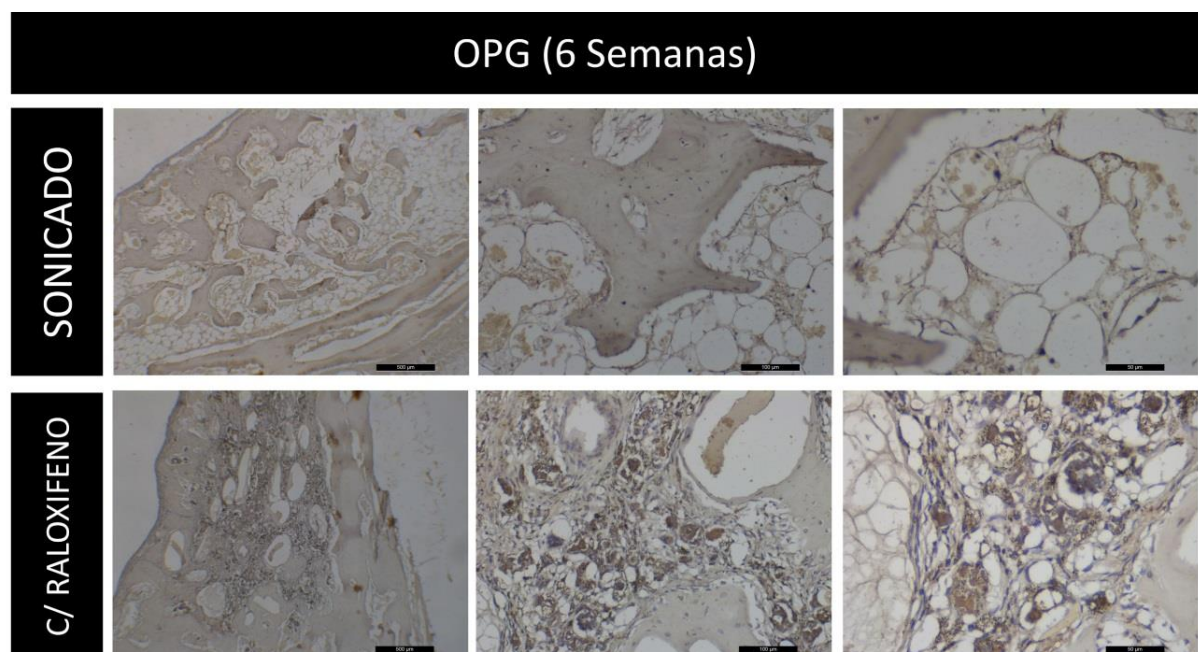
FIGURA 8 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 6 semanas. Marcação Imunoistoquímica para OCN.



Fonte: Autor, 2021

A imunomarcção de OPG apresentou score 2 para o grupo BS e score 3 para o grupo BR (Fig. 7). A OPG, um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), responsável por inibir respostas de reabsorção óssea provocadas pela RANK-L, outro membro desta família de TNF. A osteoprotegerina mostrou-se presente de forma moderada no grupo submetido ao processamento ultrassônico sem raloxifeno. Já no grupo com raloxifeno, observou-se uma marcação intensa para osteoprotegerina e mais uma vez foi possível observar a presença de macrófagos presentes no sítio reparacional.

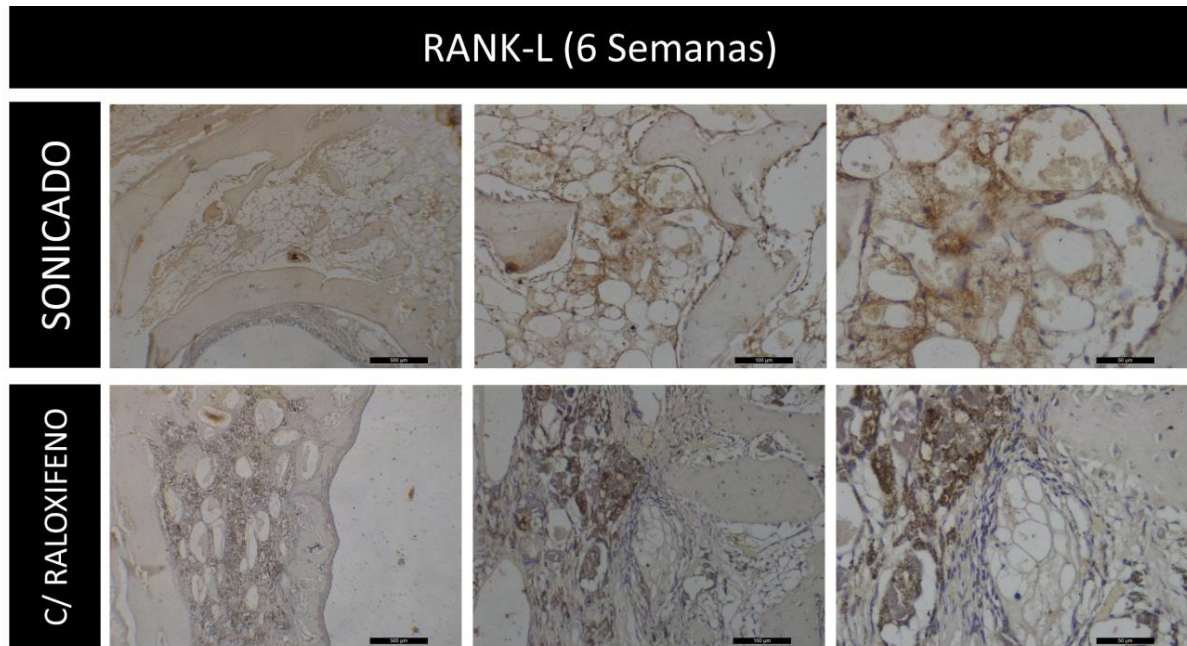
FIGURA 9 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 6 semanas. Marcação Imunoistoquímica para OPG



Fonte: Autor, 2021

A imunomarcção de RANK-L apresentou score 3 para ambos os grupos (Fig. 7). Vale destacar que a presença equilibrada entre OPG e RANK-L mostram que atividades de formação e reabsorção óssea ocorrem de maneira semelhante e esta característica foi observada no grupo raloxifeno.

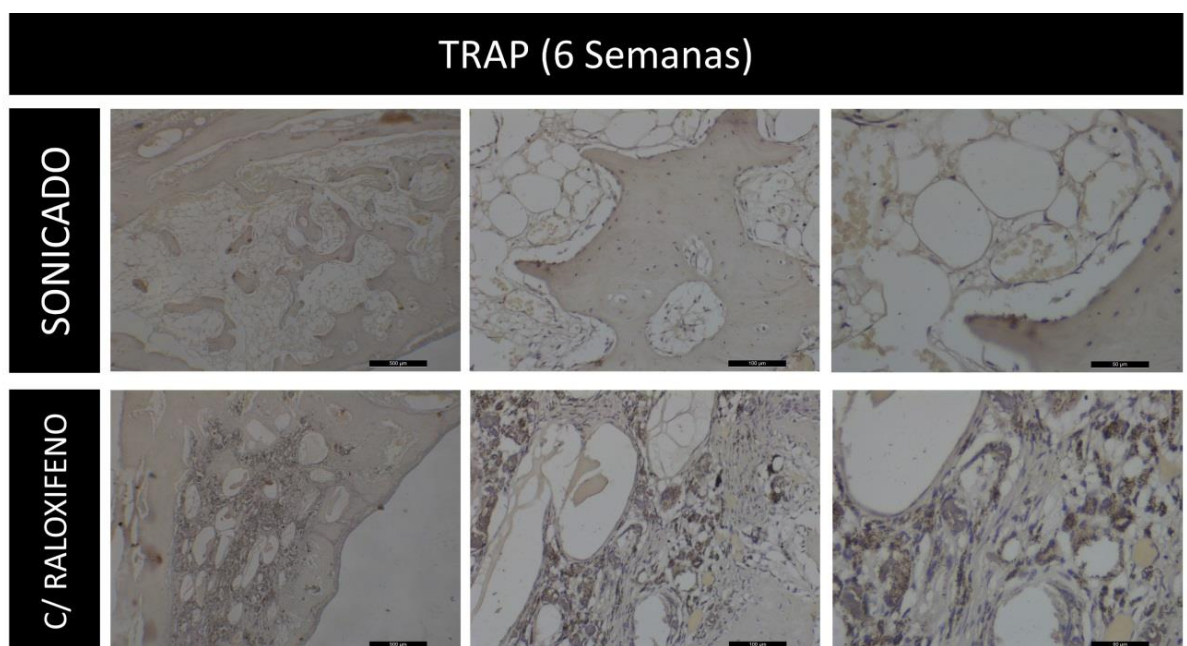
FIGURA 10 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 6 semanas. Marcação Imunoistoquímica para RANK-L



Fonte: Autor, 2021

A imunomarcção de TRAP apresentou score 2 para o grupo BS e score 3 para o grupo BR (Fig. 7). Representando que nos dois grupos os osteoclastos se encontram em atividade de reabsorção óssea. Muitos dos macrófagos positivos para OPG e RANK-L encontravam-se também marcados para TRAP.

FIGURA 11 – Fotomicrografia dos seios maxilares para ambos os grupos (BR e BS) no período de 6 semanas. Marcação Imunoistoquímica para TRAP



Fonte: Autor, 2021

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A proposta de otimização do Bio-oss® pelo processamento ultrassônico e associação com raloxifeno evidenciou resultados insatisfatórios para o grupo BR, mas apresentou resultados satisfatórios para o grupo BS. Os dados do grupo BS corroboraram com os dados já descritos na literatura, que mostram em trabalhos pré-clínicos (6, 30) e clínicos realizados com o Bio-oss®,(13) que este biomaterial apresenta importante papel osteocondutor, atingindo reparo ósseo satisfatório.

O grupo BS apresentou reparo ósseo satisfatório desde o período inicial (2 semanas), todavia, o grupo de associação com raloxifeno (BR) apresentava intenso infiltrado inflamatório neste período, que se perpetuou até o período de 6 semanas. Por outro lado, o grupo BR mostrou maior intensidade de marcação imunoistoquímica que o grupo BS para Runx2 no período de 2 semanas e para OCN, OPG e TRAP no período de 6 semanas. A disparidade entre os dados histométricos e os scores de imunoistoquímica sugere que o grupo BR se encontrava sempre um estágio atrás no processo de reparo ósseo. Este resultado pode ter ocorrido em virtude do intenso processo inflamatório encontrado no grupo BR.

A maior presença de osteoblastos na avaliação histológica do grupo BS às 2 semanas, frente ao grupo BR que, contraditoriamente, apresentava maior marcação para Runx2 sugere que neste momento do reparo ósseo a diferenciação celular já havia ocorrido no grupo BS, de maneira que a imunomarcação de Runx2 já se encontrava reduzida ao se comparar com o grupo BR, que ainda estava com amplo processo inflamatório e necessitando de diferenciação celular.

Às 6 semanas o grupo BS apresentava tecido ósseo maduro, com trabéculas bem definidas e adiposo entre estas, havendo marcação leve de OCN (proteína responsável pela mineralização do tecido ósseo imaturo), diferente do grupo BR que ainda apresentava área com necessidade de mineralização, e imunomarcação moderada para esta proteína. A marcação intensa para TRAP no grupo BR, frente à marcação moderada do grupo BS, pode estar relacionada à maior quantidade de biomaterial remanescente nesse grupo ($p=0,003$), bem como à reabsorção relacionada ao processo inflamatório crônico que se manteve no grupo BR.

Embora alguns estudos pré-clínicos tenham mostrado que a administração sistêmica do raloxifeno apresente importante papel no reparo ósseo periimplantar(21) e alveolar(24), de animais submetidos à redução de densidade óssea, inclusive com resultados superiores a outros antirreabsortivos, no presente estudo, a administração local desse medicamento, associado ao

Bio-oos® pelo processamento ultrassônico (BR), não apresentou superioridade frente ao reparo ósseo do mesmo biomaterial sem o raloxifeno (BS), aplicados em preenchimento de seio maxilar de coelho.

Esta limitação pode ser justificada pelo papel pró-trombótico associado ao raloxifeno, pois este medicamento aumenta a concentração de fator de coagulação, como o fator de Von-Willenbrand e fator VIII, além de reduzirem a concentração de antitrombina e proteína C. (25) No entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão do mecanismo de ação desta droga, principalmente quando aplicada localmente.

O único trabalho presente na literatura que avaliou a associação do raloxifeno com biomaterial, por meio do processamento ultrassônico, foi realizado por Lisboa-Filho e colaboradores (17), onde foi mostrado que o reparo ósseo de defeitos críticos de calotas de ratos foi satisfatório para associação na proporção de 80% de biomaterial e 20% de raloxifeno, todavia, não foi encontrada diferença estatística. Além disso, estes pesquisadores avaliaram apenas o período de 30 dias, sendo um período tardio para este desenho experimental e, somente análise microtomográfica, que por sua vez apresenta limitações inerentes à escala de cinza selecionada pelo avaliador, por este motivo a falta de avaliação histológica, como a realizada na presente pesquisa, pode gerar uma assertiva equivocada quanto aos resultados da análise de microtomografia isolada.

A busca por associações e métodos que otimizem os resultados dos biomateriais é uma constante na literatura. O raloxifeno, como mencionado anteriormente, já foi descrito como coadjuvante a biomateriais na reparação óssea de defeito crítico em calota de ratos. (28) Além do raloxifeno, a associação com osso autógeno, na proporção de 50%, já foi descrita, inclusive em estudos clínicos, mas sem grandes vantagens frente ao biomaterial isolado. (9-12)

Nas tentativas de melhorar as propriedades osteocondutora dos biomateriais, outros estudos avaliaram a associação de substitutos ósseos a fatores de crescimento para otimizar o reparo ósseo. (15, 16, 38) Assim, Mu et al. (2020), (38) avaliaram o papel da associação de xenoenxertos à Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) e mostraram que esta associação apresenta importante otimização de parâmetros do reparo ósseo *in vitro* e *in vivo*, principalmente nos períodos iniciais de cirurgia de elevação de membrana sinusal em coelhos. Os resultados menos favoráveis, como foram vistos na associação avaliada na presente pesquisa, foram igualmente encontrados para associação com a rhBMP-2, em estudos clínicos e revisão sistemática de cirurgia de elevação de membrana sinusal. (16, 39)

O método de preparo do biomaterial pelo processamento ultrassônico, por sua vez, foi avaliado e teve sua proposta de padronização de tempo sugerida por Gomes-Ferreira *et al.* (2019), (28) onde foi notado que o tempo de 15 minutos, o mesmo adotado nesta pesquisa, apresenta os melhores resultados, otimizando o turnover ósseo, a qualidade e quantidade de tecido ósseo, além de melhores propriedades de matriz extracelular. Um outro método de otimização de biomateriais para enxertia de seio maxilar, recentemente descrito por Hirota *et al.* (2020) (40) é a técnica de bioativação por meio de plasma de argon, que promete melhora na adesão celular e consequente otimização no reparo ósseo. Estes pesquisadores encontraram resultados otimistas para este outro método de tratamento dos biomateriais.

O processamento ultrassônico altera a macroestrutura e reduz o tamanho das partículas do biomaterial, como demonstrado por Gomes-Ferreira *et al.* (2019), (28) acelerando o processo de fagocitose desse biomaterial. Este fator pode influenciar na quantidade de biomaterial remanescente, pois no presente estudo nota-se que o este componente corresponde a menos de 20% das amostras, enquanto no estudo de Caneva e colaboradores (2017), (41) com o mesmo biomaterial (Bio-oss®), mas sem o processamento ultrassônico, este permanecia representando mais de 35% do volume total da área de interesse, mesmo após as 6 semanas.

Embora Pallasen e colaboradores (2002), (42) tenham reportado que enxertos de osso autógeno com menores partículas apresentem melhor desempenho, com aumento de angiogênese, formação óssea e mais fatores de crescimento, o mesmo não parece se aplicar aos biomateriais, pois segundo Karageorgiou e Kaplan (2005), (43) há necessidade de porosidade de cerca de 100µm para proporcionar a migração celular, sendo assim, biomateriais com partículas muito pequenas, como as dos biomateriais após o processamento ultrassônico, podem ter o processo de reparo prejudicado.

O presente estudo apresenta limitações inerentes ao caráter pré-clínico, bem como a falta de um grupo de controle positivo (Bio-oss®) sem processamento sonoquímico, controle negativo (coágulo). Além disso, mais estudos precisam ser realizados para compreender tempo e mecanismo de liberação do raloxifeno, bem como avaliação dos órgãos relacionados a alterações provenientes do uso do raloxifeno sistêmico.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a associação do raloxifeno, pelo processamento ultrassônico, ao contrário do esperado, atrasou o reparo ósseo. Por outro lado, o processamento ultrassônico foi favorável ao reparo ósseo, com aumento de osso neoformado.

REFERÊNCIAS

1. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980;38(8):613-6.
2. Tatum H, Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am.* 1986;30(2):207-29.
3. Abdulkarim HH, Miley DD, McLeod DE, Garcia MN. Short-term evaluation of bioactive glass using the modified osteotome sinus elevation technique. *Implant Dent.* 2013;22(5):491-8.
4. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury.* 2021.
5. Misch CE, Dietsh F. Endosteal implants and iliac crest grafts to restore severely resorbed totally edentulous maxillae--a retrospective study. *J Oral Implantol.* 1994;20(2):100-10.
6. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(1):114-20.
7. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014;13(4):464-70.
8. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(3):315-24.
9. Pereira RDS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(5):867-75.
10. Pereira RS, Gorla LF, Boos F, Okamoto R, Garcia Junior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(4):503-10.
11. Pereira RS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Comparative study of volumetric changes and trabecular microarchitecture in human maxillary sinus bone augmentation with bioactive glass and autogenous bone graft: a prospective and randomized assessment. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(5):665-71.
12. Menezes JD, Pereira RDS, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170296.

13. Bonardi JP, Pereira RDS, Boos Lima F, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, et al. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(2):325-35.
14. Meloni SM, Jovanovic SA, Lolli FM, Cassisa C, De Riu G, Pisano M, et al. Grafting after sinus lift with anorganic bovine bone alone compared with 50:50 anorganic bovine bone and autologous bone: results of a pilot randomised trial at one year. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015;53(5):436-41.
15. Schmitt C, Lutz R, Doering H, Lell M, Ratky J, Schlegel KA. Bio-Oss(R) blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(4):450-60.
16. Kao DW, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32(1):61-7.
17. Lisboa-Filho PN, Gomes-Ferreira PHS, Batista FRS, Momesso GAC, Faverani LP, Okamoto R. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. *Connect Tissue Res.* 2018;59(sup1):97-101.
18. Kavas A, Keskin D, Altunbas K, Tezcaner A. Raloxifene-/raloxifene-poly(ethylene glycol) conjugate-loaded microspheres: A novel strategy for drug delivery to bone forming cells. *Int J Pharm.* 2016;510(1):168-83.
19. Maximov PY, Lee TM, Jordan VC. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol.* 2013;8(2):135-55.
20. Yogui FC, Momesso GAC, Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Hassumi JS, 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.* 2018;26:e20170329.
21. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR, Jr., Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(6):798-805.
22. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):255-65.
23. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20(3):038003.
24. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig.* 2017;21(5):1485-94.

25. Adomaityte J, Farooq M, Qayyum R. Effect of raloxifene therapy on venous thromboembolism in postmenopausal women. A meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2008;99(2):338-42.
26. Lagari V, Gavcovich T, Levis S. The Good and the Bad About the 2017 American College of Physicians Osteoporosis Guidelines. *Clin Ther.* 2018;40(1):168-76.
27. Lin TC, Lee CH, Yang CY, Yang YH, Lin SJ. Incidence and risk of venous thromboembolism among Taiwan osteoporotic fracture population under osteoporosis pharmacological treatments. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1599-607.
28. Gomes-Ferreira PHS, Lisboa-Filho PN, da Silva AC, Bim-Junior O, de Souza Batista FR, Ervolino-Silva AC, et al. Sonochemical time standardization for bioactive materials used in periimplantar defects filling. *Ultrason Sonochem.* 2019;56:437-46.
29. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(4):256-60.
30. Caneva M, Lang NP, Garcia Rangel IJ, Ferreira S, Caneva M, De Santis E, et al. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss((R)) or Gingistat((R)) collagen sponge: an experimental study in rabbits. (1600-0501 (Electronic)).
31. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clinical oral implants research.* 2002;13(4):405-9.
32. Merz WA. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe. *Mikroskopie.* 22:132-42.
33. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connective tissue research.* 2003;44 Suppl 1:109-16.
34. Hughes SS, Hicks DG, O'Keefe RJ, Hurwitz SR, Crabb ID, Krasinskas AM, et al. Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 1995;10(4):533-44.
35. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(15):9656-61.
36. Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Basle MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron.* 2010;41(4):321-6.
37. Dos Santos Pereira R, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR, Jr., Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft:

Immunohistochemical Assessment of RUNX2, VEGF, TRAP, and Osteocalcin. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2017;37(6):e321-e7.

38. Mu Z, He Q, Xin L, Li Y, Yuan S, Zou H, et al. Effects of injectable platelet rich fibrin on bone remodeling in combination with DBBM in maxillary sinus elevation: a randomized preclinical study. *Am J Transl Res*. 2020;12(11):7312-25.

39. Kelly MP, Vaughn OL, Anderson PA. Systematic Review and Meta-Analysis of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Localized Alveolar Ridge and Maxillary Sinus Augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74(5):928-39.

40. Hirota A, Yamada Y, Canullo L, Xavier SP, Baba S. Bioactivation of Bovine Bone Matrix Using Argon Plasma: An Experimental Study for Sinus Augmentation in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(4):731-8.

41. Caneva M, Lang NP, Garcia Rangel IJ, Ferreira S, De Santis E, Botticelli D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss(®) or Gingistat(®) collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(7):e21-e30.

42. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(4):498-506.

43. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



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 "**Estudo experimental do reparo ósseo de dois tipos de xenoinxertos alterados pelo método de sonoquímica, associado ou não ao raloxifeno em levantamento de seio maxilar de coelhos**", Processo FOA nº 00350-2019, 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 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 15 de Agosto de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Setembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Experimental study of bone repair of two types of xenografts altered by the sonochemical method, associated or not with raloxifene in rabbits maxillary sinus surgery**", Protocol FOA nº 00350-2019, 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 July 30, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 15, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 15, 2020.

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

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



Scanned with CamScanner