



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

NAARA GABRIELA MONTEIRO

Avaliação das respostas de biomineralização pelo *Rubus coreanus* frente à deficiência de estrógeno. Um estudo translacional

**Araçatuba - SP
2022**

NAARA GABRIELA MONTEIRO

Avaliação das respostas de biomineralização pelo *Rubus coreanus* frente à deficiência de estrógeno. Um estudo translacional

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

Orientadora: Prof^a. Assoc. Roberta Okamoto.
Coorientador: Prof. Assoc. Paulo Noronha Lisboa Filho

**Araçatuba - SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M775a Monteiro, Naara Gabriela.
Avaliação das respostas de biomineralização pelo
Rubus coreanus frente à deficiência de estrógeno: um
estudo translacional / Naara Gabriela Monteiro. -
Araçatuba, 2022
73 f. : il.; tab.

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

1. Osteogênese 2. Osteoporose 3. Osseointegração
4. Rubus coreanus I.T.

Black D7
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Dedicatória

À minha mãe Rosa e meu pai Alcides,

Mãe, obrigada por ser minha maior fonte de inspiração e minha melhor amiga. Sou grata a Deus por ter você em minha vida. Dedico a você tudo que sou e tudo que conquistei pois sem o seu apoio nada disso seria possível. Obrigada por acreditar em meu potencial mais do que eu mesmo.

Ao meu pai que sempre se esforçou para fazer meus sonhos possíveis. Suas orações em meu favor me sustentaram até este momento. Sem vocês eu jamais chegaria até aqui.

À minha avó Iris (*in memoriam*),

Obrigada por ter sido minha amiga e intercessora. Sou grata a Deus por ter tido a oportunidade de aprender tanto contigo. Seus ensinamentos estarão sempre guardados em minha memória.

Agradecimentos especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus,

Agradeço pelo dom da vida, por todas oportunidades e bênçãos que ELE me concedeu durante esta jornada. Sou grata por ter me permitido viver o teu propósito e me ensinado em cada detalhe. Pela força, sabedoria e fé que me destes nos momentos em que mais precisei. Sou grata por cada momento que vivi, pois Tú nunca me abandonou, e sempre provou tua fidelidade e bondade infinita. Obrigada por ser meu melhor amigo! Te amo mais que tudo, Deus!

À minha querida orientadora Prof^a. Assoc. Roberta Okamoto,

Sou imensamente grata pela oportunidade que me destes e por toda confiança em mim depositada, é uma honra caminhar contigo. Agradeço por todo aprendizado, companheirismo e amizade. Obrigada por ser minha inspiração! É um privilégio estar nesta jornada aprendendo com a senhora. Obrigada por ser esse ser humano incrível e com um coração enorme!

Ao meu coorientador, Prof. Assoc. Paulo Noronha Lisboa Filho,

Agradeço pela coorientação e contribuição valiosa neste estudo. Sua disponibilidade e auxílio foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Assoc. Luana Marotta Reis Vasconcellos,

Agradeço pela contribuição valiosa neste estudo. Sua disponibilidade e auxílio foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora

Professor Dr. Francisley Ávila Souza, admiro o senhor pelo seu trabalho assim como pela sua pessoa. Obrigada por cada conhecimento transmitido desde as atividades ambulatoriais até as atividades hospitalares. Agradeço pela amizade e convívio. É uma honra aprender contigo.

Professor Dr. André Luís Fabris, agradeço a participação como banca avaliadora deste trabalho. Sou uma admiradora do seu trabalho e agradeço por poder contar com as suas contribuições na avaliação deste estudo.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Agradeço por todos os momentos de convívio e os conhecimentos que foram compartilhados durante o meu mestrado. Vocês têm a minha admiração.

Aos amigos de Pós-Graduação do LSMT

Pedro Henrique Ferreira, Fábio Batista, Letícia Pitol, Ana Cláudia Ervolino, Paula Frigério e Juliana Moura, agradeço pela disponibilidade e ajuda durante a execução deste projeto. Obrigada por cada ensinamento e conhecimento compartilhado ao longo destes anos. Obrigada pela amizade que construímos.

Aos alunos de Iniciação Científica do LSMT

Ana Carolina Passos, Tatiany Castro, Odir Nunes, Isadora Castaldi, Daniel Leao, Laura Macedo, Bruna Namba, Carolina Wajima, agradeço por toda ajuda ao longo destes anos. Agradeço especialmente ao aluno **Odir Nunes**, a qual foi meu braço direito durante a realização deste estudo. Obrigada por todo apoio e por estar sempre disposto a aprender. Fico extremamente orgulhosa da sua evolução e desempenho.

Aos meus familiares, agradeço por todo apoio. Vocês foram fundamentais neste processo.

Às minhas grandes amigas, Ana Carolina Bacelar e Nataira Momesso, agradeço por cada momento e experiência compartilhada. Obrigada por estarem comigo nesta jornada e por serem pessoas com quem eu posso contar.

Aos meus amigos, agradeço pelo apoio, parceria e companheirismo.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do diretor **Professor Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Professor Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba na pessoa do coordenador **Professor Assoc. Wirley Gonçalves Assunção** e do vice-coordenadora **Professora Assoc. Roberta Okamoto**.

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

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão de bolsa de mestrado durante dois meses (processo: 131311/2020-4)

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo: 2020/02798-3)

À **Titaniumfix**, pelo fornecimento dos discos de titânio e implantes osseointegráveis utilizados neste estudo.

Ao **Laboratório Multiusuário da FOA-UNESP e à FINEP** (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011).

Aos meus queridos **professores** ao longo da pós-graduação, pessoas das quais admiro muito e me inspiro profissionalmente. Muito obrigada por ensinar com sabedoria e excelência.

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

Ao Departamento de Ciências Básicas, pelo acolhimento e por viabilizar a execução de todas as etapas deste estudo. Obrigada aos **professores da Disciplina de Histologia e Embriologia** (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof^a Dr^a. Mariza Akemi Matsumoto, Prof^a Dr^a Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos **professores da Disciplina de Anatomia** (Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto), aos **funcionários** e todos os outros **estagiários**. Muito obrigada por toda ajuda e pelo acolhimento durante estes anos de convívio.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial** (Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Prof^a. Dr^a. Alessandra Aranega, Prof^a Dr^a Ana Paula Bassi, Prof^a. Dr^a Daniela Ponzoni, e Prof. Dr. Leonardo Peres Faverani) pelos ensinamentos práticos e teóricos ao longo destes anos.

Aos **colegas de pós-graduação da equipe de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial**, agradeço pelos momentos em que pudemos passar juntos onde pude aprender muito com cada um de vocês

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela ajuda e pelo funcionamento dos diversos setores da nossa instituição. Muito obrigada!

Agradeço a todos que torceram por mim, de longe ou de perto e que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste sonho.

Epígrafe

*“Para tudo há uma ocasião, e um tempo para cada propósito debaixo do
céu.”*

Eclesiastes 3:1

Resumo

MONTEIRO, N. G. **Avaliação das respostas de biomineralização pelo *Rubus coreanus* frente à deficiência de estrógeno. Um estudo translacional.** 2022. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Caracterização da ação local do *Rubus coreanus* através da funcionalização da superfície dos implantes a serem instalados. Realizado em 2 etapas. Na primeira etapa, foi realizada a caracterização da superfície de implantes funcionalizadas pelos fármacos, a partir de teste físico químico e testes biológicos em culturas de células. Para a cultura de células foram utilizadas células mesenquimais indiferenciadas, isoladas de fêmures de ratas. Foram avaliadas a atividade e a diferenciação celular. Posteriormente, foi realizada a segunda etapa onde foram executados os experimentos in vivo. Para tanto, foram utilizadas 80 ratas Wistar adultas jovens, fêmeas, sendo 32 ratas para o primeiro período de eutanásia (14 dias), e 48 ratas para o segundo período de eutanásia (28 dias). Os grupos experimentais são: SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200 e OVX RC 400, sendo que os animais OVX foram submetidos a ovariectomia bilateral, enquanto que os animais SHAM foram submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral. Passados 30 dias, todos animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes nas metáfises tibiais. Os implantes tiveram as superfícies tratadas com DMSO ou RC 200 ou RC 400, e houve o controle negativo realizado através dos implantes convencionais. A eutanásia dos animais do primeiro período de eutanásia aconteceu aos 14 dias após a instalação dos implantes e as tíbias foram destinadas para a análise biomecânica (contra-torque). Para os animais do segundo período de eutanásia, aos 28 dias após a instalação dos implantes foi realizada a eutanásia dos animais, e as tíbias foram destinadas para as seguintes análises: biomecânica (contra-torque), enquanto do lado contralateral foi realizada a microtomografia computadorizada para avaliação morfométrica do osso formado ao redor dos implantes instalados. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de homocedasticidade para a seleção do teste estatístico apropriado (paramétrico ou não paramétrico), com nível de significância de 5%. Através das análises biomecânica e microtomográfica foi possível verificar resultados semelhantes entre os grupos experimentais. Contudo, o

rubus coreanus não foi capaz de atuar de forma positiva no processo de reparo ósseo perimplantar.

Palavras-chave: Osteogênese. Osteoporose. Osseointegração. Rubus coreanus.

Abstract

MONTEIRO, N. G. **Evaluation of biomineralization responses by *Rubus coreanus* to estrogen deficiency. A translational study.** 2022. 73 f. Master's Degree (Dissertation) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Characterization of the local action of *Rubus coreanus* through the functionalization of the surface of the implants to be installed. Carried out in 2 steps. In the first stage, the characterization of the surface of implants functionalized by drugs was carried out, based on physical-chemical tests and biological tests on cell cultures. For cell culture, undifferentiated mesenchymal cells, isolated from femurs of rats, were used. Cell activity and differentiation were evaluated. Subsequently, the second stage was carried out, where the in vivo experiments were performed. For that, 80 young adult female Wistar rats were used, 32 rats for the first period of euthanasia (14 days), and 48 rats for the second period of euthanasia (28 days). The experimental groups are: SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200 and OVX RC 400, with the OVX animals undergoing bilateral ovariectomy, while the SHAM animals underwent submitted to sham surgery of bilateral ovariectomy. After 30 days, all animals underwent surgery to install the implants in the tibial metaphysis. The implants had their surfaces treated with DMSO or RC 200 or RC 400, and there was a negative control performed using conventional implants. The animals from the first period of euthanasia were euthanized 14 days after implant placement and the tibiae were destined for biomechanical analysis (counter-torque). For animals in the second period of euthanasia, 28 days after implant placement, the animals were euthanized, and the tibiae were destined for the following analyses: biomechanics (counter-torque), while on the contralateral side, computerized microtomography was performed for morphometric evaluation of the bone formed around the installed implants. Quantitative data were submitted to the homoscedasticity test to select the appropriate statistical test (parametric or non-parametric), with a significance level of 5%. Through biomechanical and microtomographic analyzes it was possible to verify similar results between the experimental groups. However, *rubus coreanus* was not able to act positively in the peri-implant bone repair process.

Keywords: Osteogenesis. Osteoporosis. Osseointegration. *Rubus coreanus*.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Técnica cirúrgica para a remoção bilateral dos ovários	41
FIGURA 2-	Dimensões do implante instalado nas tíbias das ratas	43
FIGURA 3-	Técnica para instalação dos implantes nas metáfises tibiais	44
FIGURA 4-	Desenho experimental relacionado ao primeiro período de eutanásia (14 dias após a instalação dos implantes)	44
FIGURA 5-	Desenho experimental relacionado ao segundo período de eutanásia (28 dias após a instalação dos implantes)	46
FIGURA 6-	Análise da morfologia celular através de fluorescência direta	54

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Distribuição dos animais para os respectivos períodos de eutanásia	40
TABELA 2-	Distribuição das tíbias dos grupos experimentais referente a avaliação perimplantar mediante as análises	45
TABELA 3-	Distribuição das tíbias dos grupos experimentais referente a avaliação perimplantar mediante as análises	46

Lista de gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1- Gráfico referente a média dos resultados do ensaio MTT 50
(viabilidade celular) aos 7 dias
- GRÁFICO 2- Gráfico referente a média dos resultados de proteína total aos 51
7 dias
- GRÁFICO 3- Gráfico referente a média dos resultados de fosfatase alcalina 52
aos 7 dias
- GRÁFICO 4- Gráfico referente a média dos resultados de formação de 53
nódulos de mineralização aos 7 dias
- GRÁFICO 5- Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 14 55
e 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre
os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200,
SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX
RC 400
- GRÁFICO 6- Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos 56
SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400,
OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400
- GRÁFICO 7- Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação 57
entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200,
SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX
RC 400
- GRÁFICO 8- Quantificação espessura das trabéculas ósseas. Comparação 58
entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200,
SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX
RC 400
- GRÁFICO 9- Quantificação do número de trabéculas ósseas. Comparação 59
entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200,
SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX
RC 400
- GRÁFICO 10- Quantificação da separação entre as trabéculas ósseas. 60
Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO,
SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO,
OVX RC 200, OVX RC 400

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
>	Maior
μA	Microampère
μm	Micrometro
Al	Alumínio
BV/TV	Percentual de volume ósseo
CEUA- FOA	Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Cm	Centímetros
CONV	Superfície convencional
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	Gramas
Kg	Quilograma
Kv	Quilovolt
LSMT	Laboratório para estudo de tecido mineralizado
M	Massa molar
mg/Kg	Miligramas por quilograma
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
min	minutos
ml	Mililitros
Mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
MTT	Ensaio de viabilidade celular
n	Número
N.cm	Newtons por centímetro
Nm	Nanômetro
OVX	Ovariectomia
PBS	tampão fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
Po(tot)	Porosidade óssea total

PT	Proteína total
PVPI	Polivinilpirrolidona- <i>iodo</i>
RC 200	Rubus coreanus 200ug/ml
RC 400	Rubus coreanus 400ug/ml
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotações por minuto
SHAM	Animais submetidos a cirurgia fictícia
Tb. N	Número de trabéculas
Tb. S	Separação entre as trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado
Ug	Micrograma
Ul	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µmol	Micromol

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 OBJETIVO.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 1ª Etapa – Funcionalização da Superfície dos Implantes e sua caracterização físico-química e biológica	36
3.1.1 Funcionalização dos implantes e discos – Dip-coating	36
3.1.2 Experimentos de Cultura de Células, para validação biológica das superfícies a serem estudadas.....	36
3.1.2.1 Determinação da viabilidade celular – MTT	37
3.1.2.2 Análise do conteúdo de proteína total	38
3.1.2.3 Atividade da Fosfatase Alcalina	38
3.1.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização	38
3.1.2.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta	38
3.2 2ª Etapa da Pesquisa- Experimentos in vivo com o Modelo Experimental proposto	39
3.2.1 Ciclo estral.....	40
3.2.2 Ovariectomia	40
3.2.3 Funcionalização dos Implantes – Dip-coating	41
3.2.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias	42
3.2.5.1 Eutanásia – 14 dias após a instalação dos implantes	44
3.2.5.2 Eutanásia – 28 dias após a instalação dos implantes	45
3.2.6 Análise Biomecânica (Torque de Remoção)	46
3.2.7 Análise de Microtomografia Computadorizada (MicroCT)	47
3.2.8 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Resultados dos Experimentos de Cultura de Células	50
4.1.1 Determinação da viabilidade celular – MTT	50
4.1.2 Análise do conteúdo de proteína total	50
4.1.3 Atividade da Fosfatase Alcalina	51
4.1.4 Análise de formação de nódulos de mineralização	52
4.1.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta	53
4.2 Resultados "In vivo"	54

4.2.1 Resultados biomecânicos.....	54
4.2.2 Resultados Microtomográficos (MicroCT)	56
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERENCIAS.....	68
ANEXOS	72

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é a desordem metabólica do tecido ósseo comum em mulheres no período pós-menopausa, ocasionada pela deficiência de estrógeno, apresenta evolução crônica e caráter multifatorial, sendo denominada como doença esquelética sistêmica.¹⁻⁶ Caracterizada pela perda de massa óssea progressiva e modificação estrutural das trabéculas ósseas, promovida pelo desequilíbrio da atividade de remodelação óssea, como consequência, há deterioração da microarquitetura óssea que resulta em redução da resistência óssea, decorrendo em vulnerabilidade às fraturas em locais como fêmur, rádio e coluna lombar.⁷ Estas fraturas são frequentemente associadas ao aumento da morbidade e mortalidade. A doença chega a afetar um terço das mulheres com mais de 50 anos com riscos iminentes de sofrer algum tipo de fratura.^{5,6,8} Segundo o Compêndio de Osteoporose (2017), 158 milhões de indivíduos com 50 anos ou mais apresentaram alto risco de fratura osteoporótica em todo mundo no ano de 2010, e este número deve ser duplicado até 2040. Além disso, é estimado que as fraturas que resultam em maior morbidade, mortalidade e custos para a saúde pública, como fraturas de quadril, serão duplicadas em países como o Brasil até 2040.⁹

Os tipos de tratamentos referentes à osteoporose podem incluir agentes farmacológicos sintéticos ou naturais. As alternativas terapêuticas farmacológicas segundo o FDA (Food and Drug Administration) podem ser classificadas em anti-reabsortivos e anabólicos. Sendo o grupo dos anti-reabsortivos constituído pelos moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS), denosumab, calcitonina e bisfosfonatos. Já o paratormônio (PTH) e o ranelato de estrôncio são agentes anabólicos, ou seja, estimulam a neoformação óssea.¹⁰ Apesar das diversas opções terapêuticas disponíveis comercialmente, a primeira escolha para o tratamento da osteoporose tem sido medicações antirreabsortivas da classe dos bisfosfonatos, pelo fato de possuírem uma resposta antirreabsortiva indiscutível.¹¹ Entretanto, para a odontologia há receios quanto a sua utilização devido à ocorrência de osteonecrose dos maxilares causadas por fármacos como os bisfosfonatos.¹²

Nos dias atuais há maior procura por alternativas terapêuticas naturais para prevenir e/ou tratar a osteoporose em mulheres, dentre elas podemos citar o

Rubus coreanus. O extrato do *Rubus coreanus* (Rc) têm sido utilizado pelas mulheres pelo fato de possuir efeitos estrogênicos no tecido ósseo,¹³ porém seu mecanismo de ação ainda não foi bem elucidado na literatura. Estudos realizados in vitro apontam propriedades benéficas do Rc como seu efeito anti-inflamatório, antiviral, anti-carcinogênese e antioxidante.¹⁴ Além das propriedades citadas o *Rubus* desempenha efeitos positivos no tecido ósseo, promove o aumento da diferenciação de osteoblastos e apoptose de osteoclastos, aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), secreção de osteocalcina e colágeno, ou seja proporciona a remodelação óssea semelhante ao fisiológico havendo então equilíbrio entre formação óssea e reabsorção, dessa forma o tecido ósseo é um tecido vital e apresenta respostas fisiológicas adequadas, o que não acontece com o uso dos bisfosfonatos.¹⁴ A atuação do Rc pode resultar em prevenção da osteoporose e doenças ósseas inflamatórias, além disso a suplementação com *Rubus* diminui a apoptose e a produção de mediadores inflamatórios induzidos por estresse oxidativo em osteoblastos.¹⁵

Os estudos preliminares desenvolvidos (Processo FAPESP: 2016/08618-1 e 2016/08617-5) com o Rc sistêmico em condições de deficiência de estrógeno mostraram o seu efeito positivo na dinâmica óssea reparacional alveolar e perimplantar, além disso o Rc parece ter uma atuação preventiva favorável no tecido ósseo reparacional quando há ausência da interferência sistêmica. Evidência in vivo sugere o efeito benéfico do *Rubus* em ratas ovariectomizadas sem efeitos colaterais indesejáveis no útero e em outros órgãos sólidos.¹⁵ Entretanto, é preciso ter ressalvas com a administração sistêmica pois os metabólitos plasmáticos são semelhantes entre animais que foram submetidos à administração de alendronato quando comparados com animais que receberam Rc.¹⁶

Com o aumento da expectativa de vida houve um crescimento pela busca por tratamentos reabilitadores, como implantes dentários osseointegrados, entretanto os pacientes em sua esmagadora maioria apresentam distúrbios no tecido ósseo decorrente da presença de interferências sistêmicas que afetam a qualidade e quantidade óssea, no entanto, os pacientes que apresentam comprometimento ósseo, como no caso da osteoporose, também precisam ser reabilitados. Para que a estabilidade e longevidade dos implantes sejam obtidas em tecido ósseo comprometido alternativas terapêuticas locais se fazem necessárias.

Sendo assim, os avanços na implantodontia visam melhorias no design e superfícies dos implantes para que as respostas celulares sejam otimizadas ao redor das espiras dos implantes possibilitando melhores respostas biológicas no processo de osseointegração em tecidos comprometidos.¹⁷

As superfícies dos implantes podem ser modificadas através de diferentes métodos incluindo jateamento, ataque ácido, anodização, ou combinações dessas técnicas. As características das superfícies como topografia, molhabilidade e "coatings" contribuem de forma benéfica em processos biológicos como a diferenciação e migração dos osteoblastos tendo em vista que os contatos celulares podem ser acelerados de acordo com a superfície dos implantes, facilitando a osseointegração e a biomineralização durante o reparo ósseo perimplantar. Os "coatings" podem funcionar como perfeitos transportadores para proteínas osteoindutoras, fatores de crescimento e fármacos com atuação local no tecido ósseo aprimorando as propriedades biológicas e mecânicas perimplantares.¹⁸⁻²¹

Devido à problemática enfrentada na implantodontia com o atraso nos eventos biológicos reparacionais ao redor das espiras dos implantes frente a deficiência de estrógeno e os resultados positivos apresentados através administração sistêmica do Rc no processo de reparo ósseo perimplantar em situações de deficiência de estrógeno (Processo FAPESP: 2016/08617-5), faz-se necessário avaliar as respostas in vivo, perante a administração local do Rc através da funcionalização da superfície dos implantes em modelos experimentais de ratas saudáveis e deficientes em estrógeno para verificar o efeito local preventivo e terapêutico.

Objetivo

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como proposta avaliar o processo de reparo ósseo perimplantar perante a administração local do *Rubus coreanus* através da funcionalização da superfície dos implantes em modelos de ratas com deficiência de estrógeno e ratas saudáveis.

Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 1ª Etapa – Funcionalização da Superfície dos Implantes e sua caracterização físico-química e biológica

3.1.1 Funcionalização dos implantes e discos – Dip-coating

Os testes preliminares da funcionalização da superfície dos implantes foram realizados no Laboratório de Materiais Avançados da UNESP de Bauru, coordenado pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho. Os implantes e discos foram funcionalizados através da técnica de incorporação: Dip-coating que consiste no processo de imersão dos implantes em uma solução com a finalidade de formar camadas ao redor dos implantes. As soluções utilizadas para a funcionalização dos implantes e discos foram as seguintes Dimetilsulfóxido - DMSO (controle positivo), Rubus coreanus 400ug diluído em 100 ml de DMSO (RC maior concentração), Rubus coreanus 200ug diluído em 100ml de DMSO (RC menor concentração). Os discos e implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Titaniumfix, Brasil) foram expostos à luz UV-C por 15 minutos com a finalidade de promover micro rugosidades em suas respectivas superfícies. Em seguida os implantes e discos foram imersos nas soluções de DMSO, RC 400 e RC 200 e em seguida permaneceram em temperatura ambiente para que cada camada secasse por completo. Cinco imersões foram realizadas com o intervalo necessário entre elas para que as superfícies secassem de forma completa e natural. Finalizadas as 5 camadas os implantes foram devidamente armazenados em microtubos, enquanto os discos foram armazenados em placa e destinados à cultura de células.

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

Os discos funcionalizados (DMSO, RC 400 e RC 200) foram destinados para a cultura de células para que as respectivas superfícies fossem avaliadas biologicamente. Os experimentos de cultura de células foram realizados no laboratório da Professora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP.

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP, os experimentos de cultura de células foram executados. Os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta das amostras doadoras. Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutamina (α -MEM – Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque). No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura osteogênico de acordo com Rosa *et al.*²² 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.²² Foram plaqueadas 2×10^4 células viáveis em cada poço da microplaca de 24 poços (Nunc, Dinamarca), foi 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 triplicada,²³ sendo que cada triplicata consiste em um *pool* de células provenientes dos fêmures de 4 animais de cada grupo. O grupo controle utilizado em todos os testes foi a superfície com duplo ataque ácido da empresa Titaniumfix®.

3.1.2.1 Determinação da viabilidade celular – MTT

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-difenil tetrazolol] (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 o período de 07 dias, utilizando medida colorimétrica em

leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU), de acordo com Andrade *et al.*²⁴ Os dados foram aferidos através da absorbância.

3.1.2.2 Análise do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 07 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry *et al.*²⁵ Os procedimentos para esta análise estão descritos em Andrade *et al.*²⁴ e Prado *et al.*²⁶ Após a finalização do teste, a absorbância foi aferida espectofotometricamente a 680 nm, sendo que o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/mL.

3.1.2.3 Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica) utilizando os mesmos lisados do teste da proteína total após o período de 07 dias, e também de acordo com Andrade *et al.*²⁴ e Prado *et al.*²⁶ A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/hora/µg proteína.

3.1.2.4 Análise de formação de nódulos de mineralização

As células, foram incubadas a 37°C/5% de CO₂ por 14 dias e após este período foi quantificada a formação de nódulos de mineralização, utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma Chemical Chemical, USA), que foi mensurada no espectrofotômetro a 405nm, de acordo com Andrade *et al.*²⁵ Os valores foram obtidos em absorbância.

3.1.2.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta

Para análise da morfologia celular do citoesqueleto de actina e dos núcleos de células aderidas à superfície, as culturas cultivadas por 10 dias foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Synth, Brasil) em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram rotineiramente processadas para fluorescência,²³ utilizando Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Eugene, USA) e DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Os espécimes foram examinados no microscópio de fluorescência (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany), sob epifluorescência. As imagens digitais foram analisadas com software Axio Vision 7.0.

3.2 2ª Etapa da Pesquisa- Experimentos in vivo com o Modelo Experimental proposto

Inicialmente o projeto foi enviado para Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP e obteve parecer favorável (Processo FOA nº 410/2020).

Deste modo, 80 ratas (Wistar) fêmeas com 4 meses de idade foram divididas em oito grupos experimentais de acordo com condição de deficiência de estrógeno e funcionalização da superfície dos implantes: SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400. Os animais foram distribuídos em dois períodos de eutanásia - 14 e 28 dias (**Tabela 1**). A superfície convencional consiste em titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Titaniumfix, Brasil). Para as superfícies DMSO, RC 200 e RC 400 foi realizada a funcionalização dos implantes de superfície convencional com as respectivas soluções.

TABELA 1 – Distribuição dos animais para os respectivos períodos de eutanásia

Grupos Experimentais	Primeiro Período de Eutanásia (14 dias)	Segundo Período de Eutanásia (28 dias)
SHAM CONV	4	6
SHAM DMSO	4	6
SHAM RC 200	4	6
SHAM RC 400	4	6
OVX CONV	4	6
OVX DMSO	4	6
OVX RC 200	4	6
OVX RC 400	4	6

Fonte: Autor, 2022

3.2.1 Ciclo estral

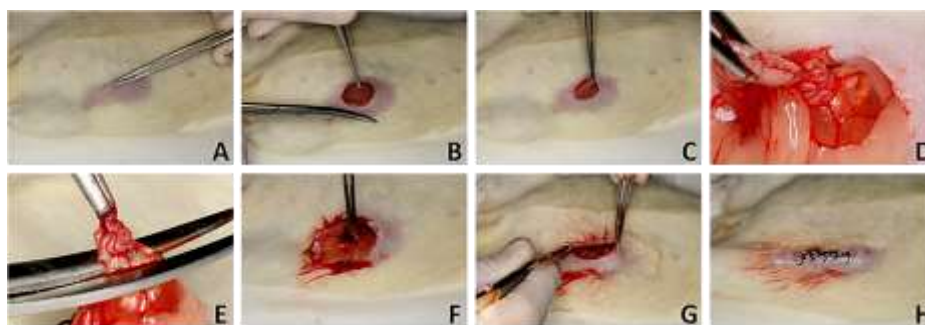
Para garantir que as ratas selecionadas para os experimentos estavam ciclando normalmente, elas foram inicialmente colocadas em gaiolas individuais e diariamente serão introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, serão aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata (técnica de Long e Evans²⁷) 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.

3.2.2 Ovariectomia

Após a validação que as ratas estavam ciclando normalmente no dia zero as mesmas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia com a finalidade de induzir a deficiência de estrógeno. Sendo assim, 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, foram localizados os ovários e os cornos uterinos que foram 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, a sutura por planos foi realizada com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). As ratas do grupo SHAM passaram pelo mesmo estresse cirúrgico pois foi realizada a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção. Como medida profilática após a cirurgia, foi utilizada 0,2 ml de um antibiótico veterinário (Penicilina com Estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular em todos os animais. **(Figura 1)**

FIGURA 1 - Técnica cirúrgica para a remoção bilateral dos ovários



A: Região do flanco da rata tricotomizada; **B:** Corte e divulsão da mesma região envolvendo pele, tecido subcutâneo e músculo abdominal; **C:** Localização da gordura branca que envolve o ovário; **D:** Identificação do ovário e laqueamento do corno uterino; **E:** Remoção do ovário; **F:** Reposicionamento dos tecidos; **G e H:** Sutura por planos.

Fonte: Autor, 2022

3.2.3 Funcionalização dos Implantes – Dip-coating

Os implantes foram funcionalizados através da técnica de incorporação: Dip-coating que consiste imersão dos implantes em uma solução com a finalidade de formar camadas ao redor dos implantes. Foram realizadas 5 camadas ao redor dos implantes de acordo com a necessidade observada através dos testes preliminares, dessa forma o maior número de camadas garante que durante a inserção dos implantes no leito cirúrgico a funcionalização da superfície não seria

perdida. A funcionalização dos implantes foi realizada com DMSO para serem instalados nos grupos SHAM DMSO e OVX DMSO, e com Rubus coreanus nas seguintes concentrações: Rubus coreanus 400ug diluído em 100 ml de DMSO (RC 400) para os grupos SHAM RC 400 e OVX RC 400, Rubus coreanus 200ug diluído em 100ml de DMSO (RC 200) para os grupos SHAM RC 200 e OVX RC 200. Após a formação das 5 camadas e secagem adequada dos implantes os mesmos foram instalados nos animais.

3.2.4 Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias

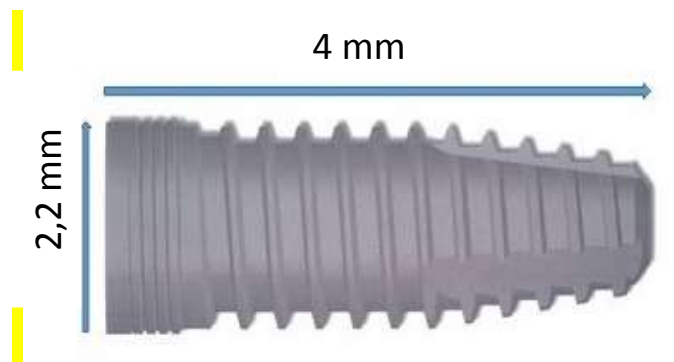
Decorridos 30 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral os animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes. Dessa forma, os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort 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, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, e antissepsia da região a ser incisada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para a instalação do implante.

Foram instalados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Titaniumfix, Brasil), com diâmetro de 2,2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama (**Figura 2**), submetidos (grupo experimental) ou não (grupo controle) à funcionalização das superfícies com o DMSO ou Rubus coreanus. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 0,9 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.

FIGURA 2 - Dimensões do implante instalado nas tíbias das ratas

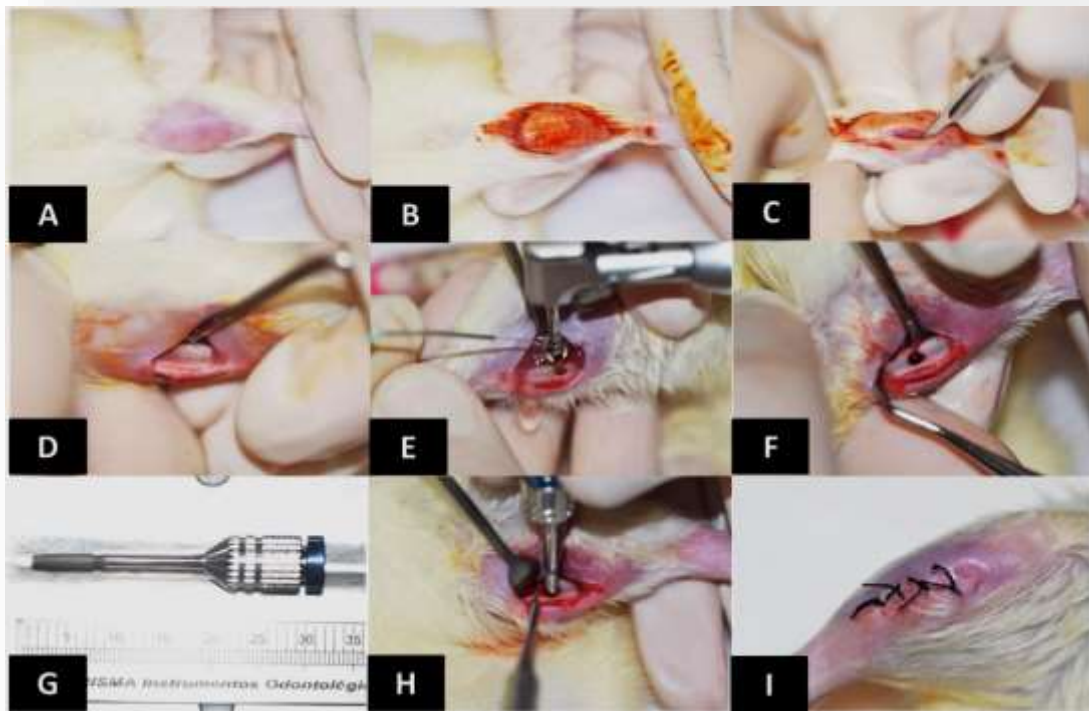


Fonte: Autor, 2022

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. **(Figura 3)**

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 durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

FIGURA 3 – Técnica para instalação dos implantes nas metáfises tibiais



Sequência do trans-operatório do procedimento de instalação dos implantes – A: Tricotomia; B: Antissepsia da região com PVPI na metáfise tibial; C: Incisão linear na lateral da metáfise tibial; D: Divulsão por planos, acesso à metáfise tibial; E: Fresagem da metáfise tibial; F: Leito ósseo fresado para a instalação do implante; G: Implante acoplado à chave digital; H: Instalação do implante com chave digital; I: Sutura.

Fonte: Autor, 2022

3.2.5.1 Eutanásia – 14 dias após a instalação dos implantes

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 14 dias após a cirurgia de instalação dos implantes. Com as tíbias coletadas foram realizadas as análises biomecânica/contra-torque.

FIGURA 4 – Desenho experimental relacionado ao primeiro período de eutanásia (14 dias após a instalação dos implantes)



Fonte: Autor, 2022

TABELA 2 – Distribuição das tíbias dos grupos experimentais referente a avaliação perimplantar mediante as análises

Grupos Experimentais	Biomecânica
SHAM CONV	4
SHAM DMSO	4
SHAM RC 200	4
SHAM RC 400	4
OVX CONV	4
OVX DMSO	4
OVX RC 200	4
OVX RC 400	4

Fonte: Autor, 2022

3.2.5.2 Eutanásia – 28 dias após a instalação dos implantes

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias após a cirurgia de instalação dos implantes. Com as tíbias coletadas foram realizadas as análises biomecânica/contra-torque e microtomografia computadorizada.

TABELA 3 – Distribuição das tíbias dos grupos experimentais referente a avaliação perimplantar mediante as análises

Grupos Experimentais	Biomecânica	Micro CT
SHAM CONV	6	6
SHAM DMSO	6	6
SHAM RC 200	6	6
SHAM RC 400	6	6
OVX CONV	6	6
OVX DMSO	6	6
OVX RC 200	6	6
OVX RC 400	6	6

Fonte: Autor, 2022

FIGURA 5 – Desenho experimental relacionado ao segundo período de eutanásia (28 dias após a instalação dos implantes)



Fonte: Autor, 2022

3.2.6 Análise Biomecânica (Torque de Remoção)

Para a análise biomecânica, os animais foram 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, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório. Após a sedação foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, e

antisepsia da região a ser incisada com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o implante. Com o auxílio de uma chave hexagonal 0,9 mm curta para catraca acoplada ao torquímetro digital os implantes foram submetidos ao torque reverso, através de um movimento anti-horário até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo completamente a interface osso/implante, foi observado e registrado o momento em que o torquímetro obteve o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

3.2.7 Análise de Microtomografia Computadorizada (MicroCT)

As tíbias do lado contralateral ao lado em que foi realizado o contra torque foram removidas após a eutanásia, fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, banhadas em água corrente por 24 horas, armazenadas em álcool 70° para o transporte até a realização da microtomografia computadorizada.

Os parâmetros avaliados seguiram o guia para a avaliação da microarquitetura óssea em roedores usando microtomografia computadorizada publicado por Buxsein *et al.* ²⁸

As peças foram escaneadas através do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 8µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.4 mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 56min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 5, correção dos anéis de artefato de 10, correção de Beam Hardening de 40% e a faixa de conversão de

imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas, sendo avaliada no plano transaxial.

Para realização das morfometrias o 3D foi utilizado o software CTAnalyser (Skyscan, Leuven, Bélgica). A padronização da região de interesse (ROI) foi padronizada através da metodologia BIC envolvendo a região de osso peri-implantar em contato com o implante. A partir da utilização da metodologia BIC, foram demarcados 30 slices correspondentes à porção medular, a partir do desaparecimento da cortical superior e aparecimento de osso medular.

A partir dessa conversão o software realizou o cálculo morfométrico aplicado ao ROI por meio dos parâmetros (BV) Volume ósseo; (BV/TV) Porcentagem de Volume Ósseo; (Tb. N) Número de Trabéculas; (Tb. Sp) Separação entre as trabéculas e (Tb.Th) Espessura do Trabeculado.²⁸

3.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade e homoscedasticidade (teste Shapiro-Wilk) o qual foi utilizado para avaliar a distribuição das amostras, que foram paramétricas. Após a confirmação da distribuição normal destas, o teste Anova Two Way seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Os testes foram realizados por meio do programa GraphPad Prism versão 7.01 para Windows. Para todos os dados, um nível de significância de 5% ($P < 0,05$) foi considerado.

Resultados

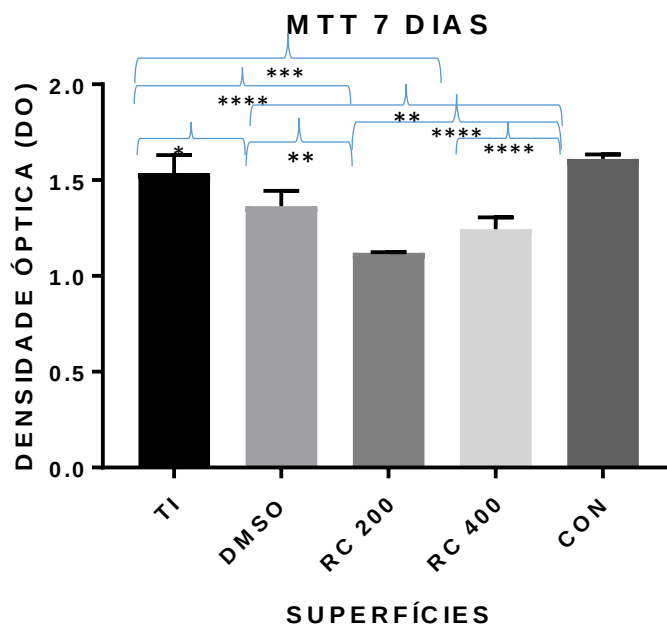
4 RESULTADOS

4.1 Resultados dos Experimentos de Cultura de Células

4.1.1 Determinação da viabilidade celular – MTT

Através do ensaio MTT aos 7 dias é possível observar os maiores valores para Ti e CON (controle de fundo do poço). Os resultados dos grupos DMSO e RC 400 apresentaram-se de forma semelhante enquanto que RC 200 teve os menores valores. Com a determinação da viabilidade celular a partir dos resultados obtidos através do ensaio do MTT foi possível constatar os seguintes percentuais de viabilidade celular frente às superfícies testadas: DMSO (83,81%), RC 200 (80%) e RC 400 (80,95%). Foi observada diferença estatística entre os seguintes grupos: Ti vs. DMSO, Ti vs. RC 200, Ti vs. RC 400, DMSO vs. RC 200, DMSO vs. CON, RC 200 vs. CON, RC 400 vs. CON. ($p < 0,05$). **(Gráfico 1)**

GRÁFICO 1 – Gráfico referente a média dos resultados do ensaio MTT (viabilidade celular) aos 7 dias

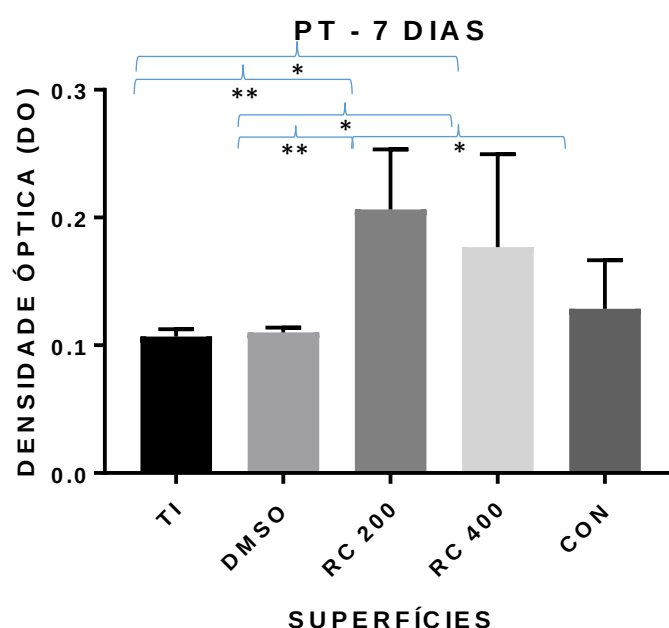


Fonte: Autor, 2022

4.1.2 Análise do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total aos 7 dias obteve os maiores valores para RC 200 e RC 400 quando comparado aos demais grupos. Embora numericamente o conteúdo de proteína total de RC 200 foi superior a RC 400 não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações. Foi observada diferença estatística entre os seguintes grupos: Ti vs. RC 200, Ti vs. RC 400, DMSO vs. RC 200, DMSO vs. RC 400, RC 200 vs. CON ($p<0,05$). **(Gráfico 2)**

GRÁFICO 2 – Gráfico referente a média dos resultados de proteína total aos 7 dias

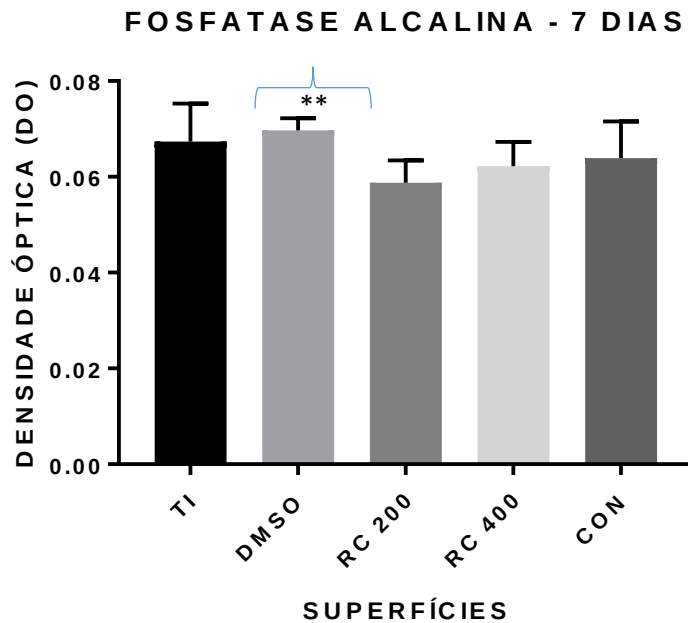


Fonte: Autor, 2022

4.1.3 Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina aos 7 dias teve sua atividade semelhante entre os grupos Ti, DMSO, RC 400 e o CON (controle de fundo do poço). O RC 200 obteve o menor valor quando comparado com os demais grupos tendo diferença estatística entre DMSO vs. RC 200 ($p<0,05$). **(Gráfico 3)**

GRÁFICO 3 – Gráfico referente a média dos resultados de fosfatase alcalina aos 7 dias

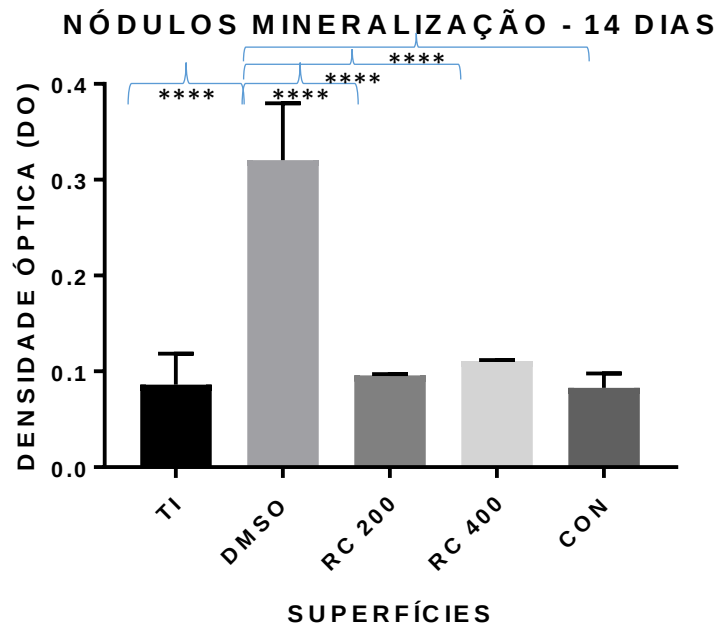


Fonte: Autor, 2022

4.1.4 Análise de formação de nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização aos 14 dias teve os maiores valores para o grupo DMSO quando comparado com os demais grupos. Os grupos Ti, RC 200, RC 400 e CON (controle de fundo do poço) tiveram resultados semelhantes. Foi observada diferença estatística entre: Ti vs. DMSO, DMSO vs. RC 200, DMSO vs. RC 400, DMSO vs. CON ($p < 0,05$). **(Gráfico 4)**

GRÁFICO 4 – Gráfico referente a média dos resultados de formação de nódulos de mineralização aos 7 dias

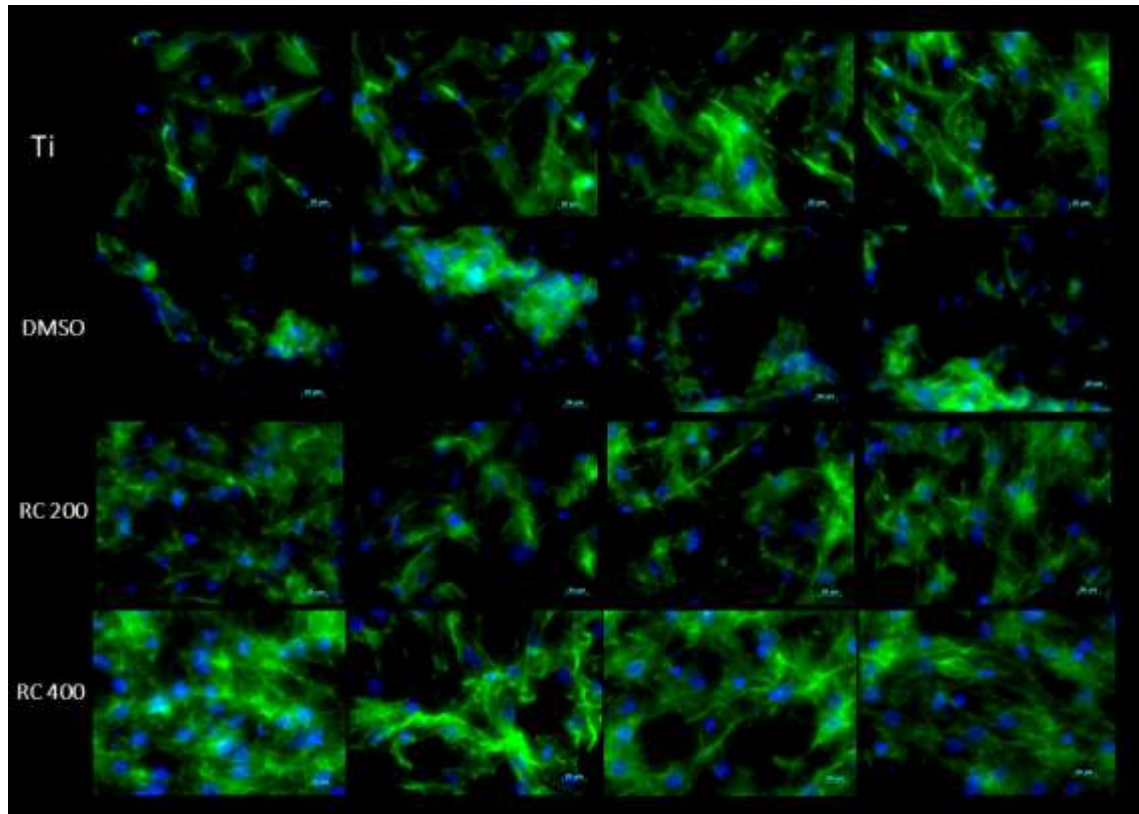


Fonte: Autor, 2022

4.1.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta

Por meio da fluorescência direta foi possível observar que a morfologia dos osteoblastos foi mantida e as superfícies testadas (Ti, DMSO, RC 200 e RC 400) não acarretaram danos aparentes à morfologia das células bem como à sua maquinaria celular. **(Figura 6)**

FIGURA 6 - Análise da morfologia celular através de fluorescência direta



Fonte: Autor, 2022

4.2 Resultados "In vivo"

4.2.1 Resultados biomecânicos

Aos 14 dias é possível observar valores de torque de remoção semelhantes entre os grupos avaliados e com ausência de diferença estatística entre os grupos (SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200 E SHAM RC 400) e (OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX 400). Nesse período inicial os valores de torque de remoção com a presença ou ausência de deficiência de estrógeno são semelhantes.

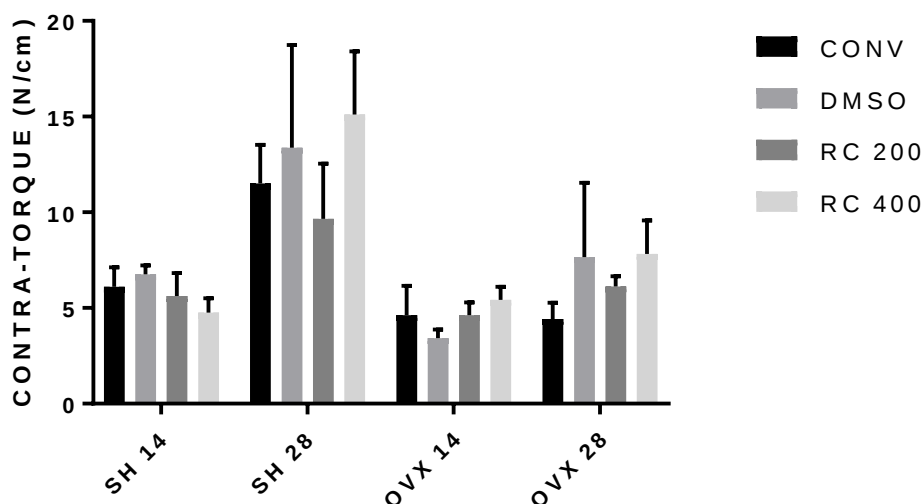
Os resultados obtidos aos 28 dias apresentaram diferenças estatísticas entre os seguintes grupos: SHAM DMSO e SHAM RC 200 (*); SHAM RC 200 e SHAM RC 400 (**). Embora não tenha diferença estatística entre os grupos SHAM CONV e SHAM RC 400 os maiores valores de torque de remoção pertencem ao grupo SHAM RC 400. Para os grupos ovariectomizados não houve diferença

estatística entre os grupos aos 28 dias, entretanto os maiores valores pertencem aos grupos OVX DMSO e OVX RC 400.

Para a análise estatística de cada superfície testada ao longo do tempo observamos as seguintes diferenças estatísticas: Convencional (SHAM CONV 14 dias x SHAM CONV 28 dias); (SHAM CONV 28 dias x OVX CONV 14 dias); (SHAM CONV 28 dias x OVX CONV 28 dias), DMSO (SHAM DMSO 14 dias x SHAM DMSO 28 dias); (SHAM DMSO 28 dias x OVX DMSO 14 dias); (SHAM DMSO 28 dias x OVX DMSO 28 dias); (OVX DMSO 14 dias x OVX DMSO 28 dias), RC 200 (SHAM RC 200 14 dias x SHAM RC 200 28 dias); (SHAM RC 200 28 dias x OVX RC 200 14 dias), RC 400 (SHAM RC 400 14 dias x SHAM RC 400 28 dias); (SHAM RC 400 28 dias x OVX RC 400 14 dias); (SHAM RC 400 28 dias x OVX RC 400 28 dias).

Aos 28 dias os valores de torque reverso dos grupos sem a interferência sistêmica são superiores ao dos grupos que apresentam a mesma, ou seja, o torque de remoção de SHAM CONV foi superior a OVX CONV, SHAM DMSO foi superior a OVX DMSO, SHAM RC 200 foi superior a OVX RC 200, e SHAM RC 400 foi superior a OVX RC 400. **(Gráfico 5)**

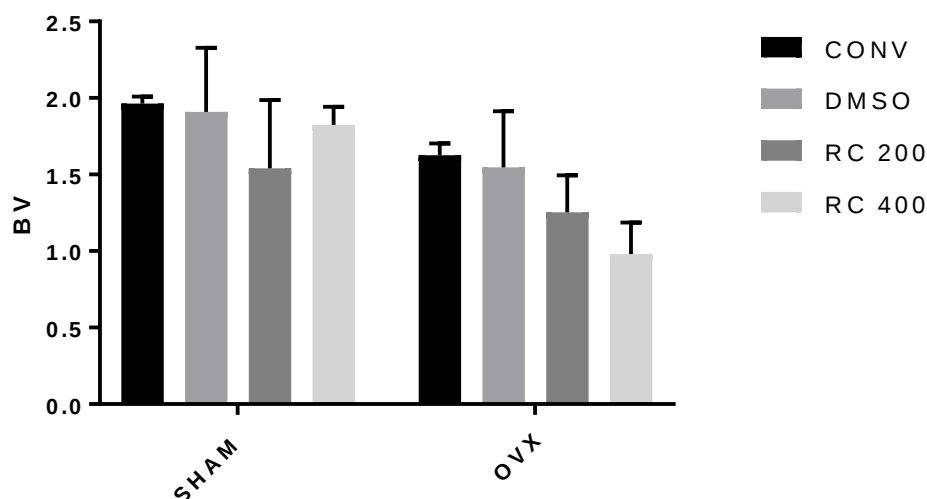
GRÁFICO 5 - Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 14 e 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



4.2.2 Resultados Microtomográficos (MicroCT)

Os valores obtidos para o parâmetro volume ósseo (BV) foram os seguintes: SHAM CONV (1,96 mm³), OVX CONV (1,63 mm³), SHAM DMSO (1,91 mm³), OVX DMSO (1,55 mm³), SHAM RC 200 (1,54 mm³), OVX RC 200 (1,25 mm³), SHAM RC 400 (1,82 mm³) e OVX RC 400 (0,98 mm³). Para o parâmetro volume ósseo não houve diferença estatística entre os grupos estudados. **(Gráfico 6)**

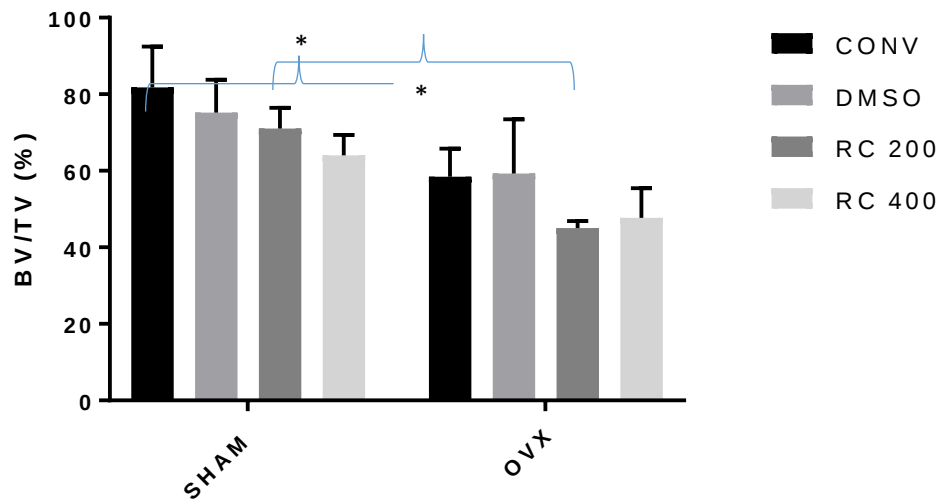
GRÁFICO 6 - Quantificação do volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



Fonte: Autor, 2022

Os resultados obtidos para percentual de volume ósseo (BV/TV) foram os seguintes: SHAM CONV (81,75%), OVX CONV (58,47%), SHAM DMSO (75,24%), OVX DMSO (59,31%), SHAM RC 200 (71%), OVX RC 200 (45,08%), SHAM RC 400 (64,05%) e OVX RC 400 (47,73%). Para BV/TV houve as seguintes diferenças estatísticas: SHAM CONV x OVX CONV (*); SHAM RC 200 x OVX RC 200 (*). **(Gráfico 7)**

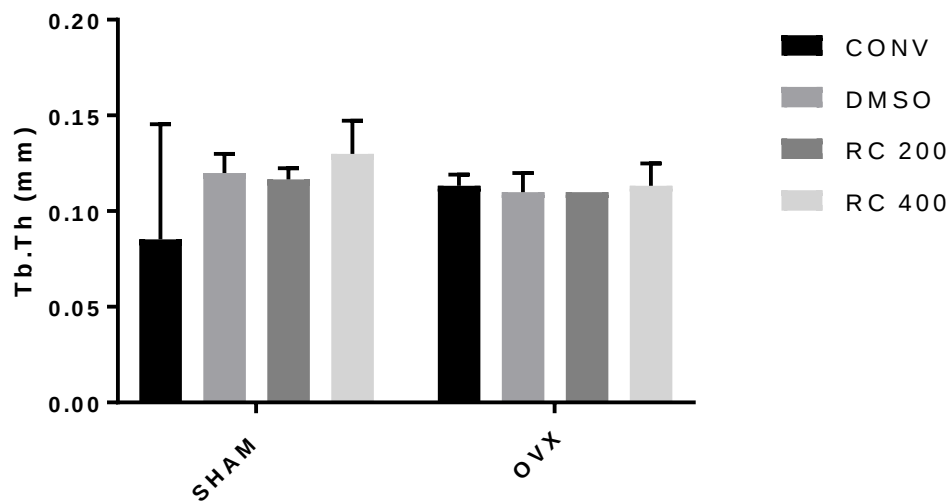
GRÁFICO 7 - Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



Fonte: Autor, 2022

Os resultados obtidos para percentual de espessura das trabéculas (Tb/Th) foram os seguintes: SHAM CONV (0,085 mm), OVX CONV (0,11 mm), SHAM DMSO (0,12 mm), OVX DMSO (0,11 mm), SHAM RC 200 (0,12 mm), OVX RC 200 (0,11 mm), SHAM RC 400 (0,13 mm) e OVX RC 400 (0,11 mm). Para o parâmetro Tb/Th não houve diferença estatística entre os grupos. **(Gráfico 8)**

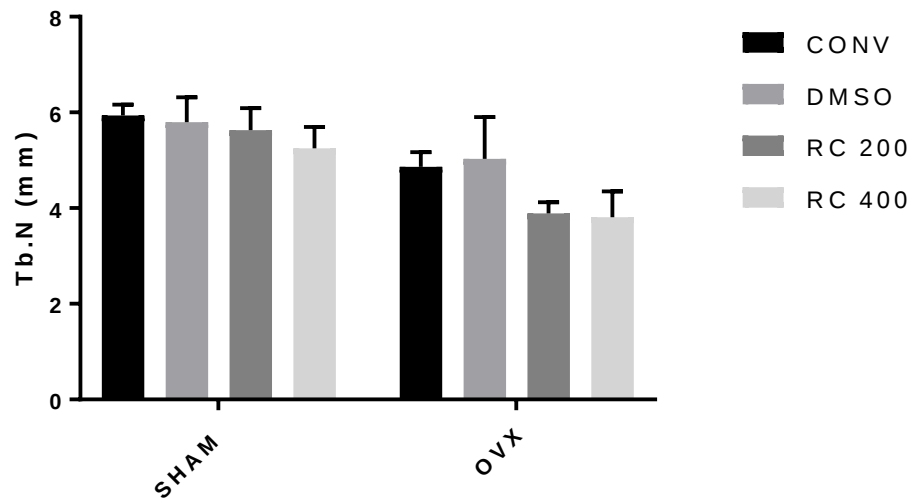
GRÁFICO 8 - Quantificação espessura das trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



Fonte: Autor, 2022

Os resultados obtidos para percentual de número de trabéculas (Tb/N) foram os seguintes: SHAM CONV (5,93 mm), OVX CONV (4,86 mm), SHAM DMSO (5,80 mm), OVX DMSO (5,03 mm), SHAM RC 200 (5,63 mm), OVX RC 200 (3,89 mm), SHAM RC 400 (5,25 mm) e OVX RC 400 (3,81 mm). Para o parâmetro Tb/N não houve diferença estatística entre os grupos. **(Gráfico 9)**

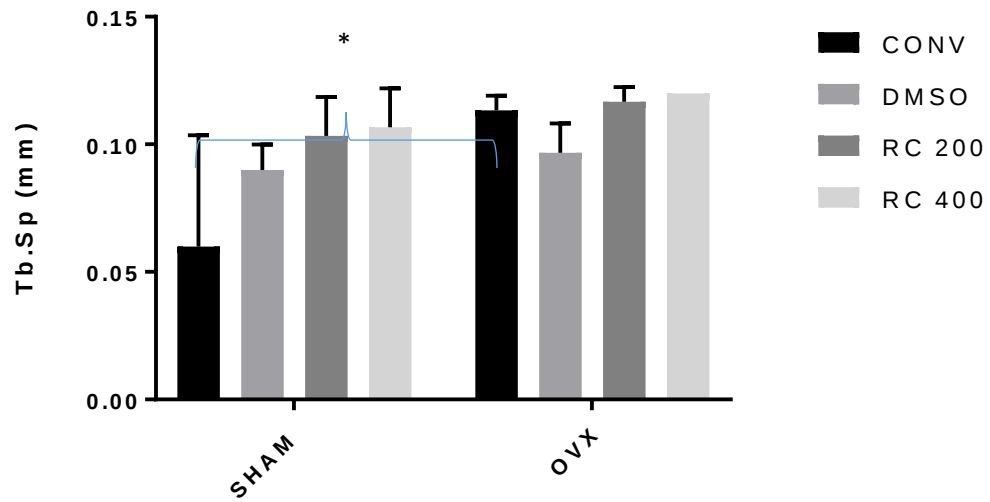
GRÁFICO 9 - Quantificação do número de trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



Fonte: Autor, 2022

Os resultados obtidos para percentual de separação das trabéculas (Tb/Sp) foram os seguintes: SHAM CONV (0,06 mm), OVX CONV (0,11 mm), SHAM DMSO (0,09 mm), OVX DMSO (0,09 mm), SHAM RC 200 (0,10 mm), OVX RC 200 (0,12 mm), SHAM RC 400 (0,11 mm) e OVX RC 400 (0,12 mm). Para o parâmetro Tb/Sp houve diferença estatística entre os grupos SHAM CONV x OVX CONV (*). **(Gráfico 10)**

GRÁFICO 10 - Quantificação da separação entre as trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400



Fonte: Autor, 2022

Discussão

5 DISCUSSÃO

O crescimento da população idosa decorrente do aumento da expectativa de vida está atrelado ao aparecimento de interferências sistêmicas. As interferências, tais como a osteoporose, quando presentes tornam os casos de reabilitação oral desafiadores devido ao prejuízo que acontece durante o processo de reparo ósseo perimplantar. Sabe-se que a qualidade do tecido ósseo que irá receber o implante é essencial para a estabilidade do implante bem como o sucesso na osseointegração.^{29,30} Os ossos longos e do complexo maxilofacial apresentam uma redução da massa óssea em pacientes que apresentam osteoporose,^{29,31} e devido às características estruturais da microarquitetura óssea dos ossos maxilares há uma redução da densidade óssea, principalmente nas regiões posteriores, desta forma a interferência sistêmica em questão quando presente diminui a estabilidade primária dos implantes³² e aumenta a perda óssea marginal,² fatores que influenciam diretamente o sucesso do tratamento reabilitador.^{29,33,34}

Em virtude do prejuízo gerado alternativas locais vêm sendo estudadas com a finalidade de proporcionar melhores condições ao osso reparacional perimplantar. A funcionalização dos implantes de titânio com fármacos que proporcionem uma atuação local tem sido uma opção inovadora que proporciona a liberação local de moléculas bioativas que atuem no tecido ósseo perimplantar. A busca por alternativas terapêuticas naturais é frequente devido aos seus efeitos colaterais serem minimizados quando comparados com fármacos sintéticos. O *rubus coreanus* é apontado como uma alternativa terapêutica sistêmica natural que possui efeitos benéficos ao tecido ósseo. Estudos apontam que sua atuação ocorre tanto em células formadoras, osteoblastos, quanto em células responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, osteoclastos.¹⁵ Embora o seu mecanismo de ação ainda não seja bem elucidado na literatura, por conta dos resultados prévios obtidos sugere-se que o *rubus coreanus* seja uma alternativa local promissora.

Sabe-se que é fundamental a realização de estudo com culturas de células para que as respostas celulares sejam avaliadas de forma isolada com o intuito de evitar danos e ausência de biocompatibilidade no estudo in vivo. Dessa forma, com o auxílio da cultura de células foi realizada a validação das superfícies testadas frente às respostas celulares. Por meio do ensaio de MTT foi possível

caracterizar a viabilidade celular tanto para o controle positivo (DMSO) quanto as concentrações de rubus coreanus testadas (RC 200 e RC 400), pois ambos se apresentaram viáveis para as células de forma semelhante. Com base nos dados obtidos para viabilidade celular foi possível observar que a substância alvo do estudo, o RC, não foi capaz de provocar danos às células.

Além de manter a viabilidade celular o RC aumentou o conteúdo de proteína total nos grupos RC 200 e RC 400. O aumento do conteúdo de proteína total demonstra que houve estímulo à maquinaria celular para que as respostas celulares acontecessem, entretanto não foi suficiente para que a atividade da fosfatase alcalina fosse superior nas superfícies teste (RC 200 e RC 400) quando comparado com as superfícies controle (CONV e DMSO). De acordo com os resultados apresentados previamente a morfologia celular foi preservada e o RC não causou danos do ponto de vista morfológico.

Através da análise biomecânica de torque de remoção realizada no experimento in vivo foi possível observar valores semelhantes de contra torque entre todos grupos experimentais (SHAM CONV, SHAM DMSO, SHAM RC 200, SHAM RC 400, OVX CONV, OVX DMSO, OVX RC 200, OVX RC 400) aos 14 dias que corresponde ao início do processo de formação óssea ao redor das espiras dos implantes, ou seja o tecido ósseo formado encontra-se nas etapas iniciais e não houve a maturação completa do mesmo. Ao observar os valores obtidos aos 28 dias é possível notar que o efeito negativo da deficiência de estrógeno para o reparo ósseo perimplantar torna-se nítido quando os valores de torque de remoção para o grupo ovariectomizado (OVX CONV) são inferiores aos obtidos no grupo saudável (SHAM CONV). Do ponto de vista biomecânico é possível constatar que as superfícies testadas (DMSO, RC 200 e RC 400) não foram capazes de melhorar a qualidade óssea e consequentemente a osseointegração.

Com a análise microtomográfica é possível avaliar a microarquitetura do tecido ósseo perimplantar. As respostas macroscópicas provenientes desta análise demonstraram que a funcionalização das superfícies dos implantes com RC não proporcionou melhorias morfométricas significativas. A caracterização das respostas celulares advindas do estudo in vivo pode evidenciar as vias ativadas ou não no quesito de biomineralização e maturação tecidual. Vale ressaltar que devido a maior complexidade do organismo quando comparado com células isoladas há a

possibilidade de resultados distintos do esperado em virtude das regulações fisiológicas bem como a sua capacidade de estabelecer mecanismos compensatórios. Desta forma, com os resultados obtidos quanto às avaliações biomecânicas e da microarquitetura perimplantar, considera-se que numa próxima etapa, estudos caracterizando as respostas celulares e moleculares serão relevantes para a completa caracterização da resposta periimplantar nas condições experimentais avaliadas

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível constatar que o *rubus coreanus* apresentou a capacidade de manter a viabilidade celular e proporcionar efeitos positivos às células osteoblásticas entretanto sua ação local através da funcionalização dos implantes não favoreceu o reparo ósseo perimplantar em ratas saudáveis e em condições de deficiência de estrógeno.

Referencias

REFERENCIAS

1. FU, S. W. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, v. 34, n. 6, p. 467-477, 2014.
2. GIRO, G. *et al.* Impact of osteoporosis in dental implants: a systematic review. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 2, p. 311-315, 2015.
3. ANIL, S. *et al.* Impact of osteoporosis and its treatment on oral health. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 346, n. 5, p. 396-401, 2013.
4. BOZIC, M.; IHAN HREN, N. Osteoporosis and mandibles. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 35, n. 3, p. 178-184, 2006.
5. KHOSLA, S.; AMIN, S.; ORWOLL, E. Osteoporosis in men. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 441-464, 2008.
6. HARVEY, N.; DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoporosis: impact on health and economics. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 2, p. 99-105, 2010.
7. GIUSTI, A.; BIANCHI, G. Treatment of primary osteoporosis in men. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 105-115, 2015.
8. COOPER, C.; FERRARI, S. L. **IOF compendium of osteoporosis**. Nyon: International Osteoporosis Foundation (IOF), 2017.
9. DELMAS, P. D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Lancet**, v. 359, n. 9322, p. 2018-2026, 2002.
10. BACCARO, L. F. *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583-591, 2015.
11. RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-2009 update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 2-12, 2009.
12. FANTI, P. *et al.* The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 8, n. 3, p. 274-281, 1998.

13. LEE, K. H.; CHOI, E. M. Rubus coreanus Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 4, p. 643-654, 2006.
14. KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5716-5727, 2012.
15. DO, S. H. *et al.* Bone-protecting effect of Rubus coreanus by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 676-683, 2008.
16. LEE, M. Y. *et al.* Metabolite profiling reveals the effect of dietary rubus coreanus vinegar on ovariectomy-induced osteoporosis in a rat model. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 149, 2016.
17. RUPP, F. *et al.* Surface characteristics of dental implants: a review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 40-57, 2018.
18. ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. On osseointegration in relation to implant surfaces. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, p. 4-7, 2019.
19. HEILAND, M.; EBKER, T. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 6285620, 2016.
20. MARENZI, G. *et al.* Effect of different surface treatments on titanium dental implant micro-morphology. **Materials**, v. 12, n. 5, p. 733, 2019.
21. BARFEIE, A.; WILSON, J.; REES, J. Implant surface characteristics and their effect on osseointegration. **British Dental Journal**, v. 218, n. 5, p. E9, 2015.
22. ROSA, M. L. *et al.* Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 205-211, 2008.
23. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-1. **Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process**. 2018. Disponível em: www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance. Acesso em: 10 jan. 2021.

24. ANDRADE, D. P. *et al.* Titanium–35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 538-544, 2015.
25. LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
26. PRADO, R. F. *et al.* Porous titanium and Ti–35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 11, p. 259, 2015.
27. LONG, J. A.; EVANS, H. M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley: University of California Press, 1922.
28. BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro–computed tomography. **Journal of bone and mineral research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
29. OLIVEIRA, D. *et al.* Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 1, p. 42-52, 2017.
30. VON WOWER, N.; KOLLERUP, G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 67, n. 5, p. 656-660, 1992.
31. MAEDA, S. S.; LAZARETTI-CASTRO, M. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 162-171, 2014.
32. MERHEB, J. *et al.* Influence of skeletal and local bone density on dental implant stability in patients with osteoporosis. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 2, p. 253-260, 2016.
33. DRAGE, N. A. *et al.* A comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 4, p. 496-500, 2007.

34. SHAPURIAN, T. *et al.* Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 21, n. 2, p. 290-297, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº 00410-2020)

	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 "Avaliação das respostas de biomineralização pelo <i>Rubus coreanus</i> frente a deficiência de estrógeno. Um estudo translacional", Processo FOA nº 00410-2020, 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 04 de Março de 2021.	
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 04 de Fevereiro de 2024. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Março de 2024.	
CERTIFICATE	
We certify that the study entitled "Evaluation of biomineralization responses by <i>Rubus coreanus</i> in estrogen deficiency. A translational study", Protocol FOA nº 00410-2020, 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 March 04, 2021.	
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 04, 2024. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 04, 2024.	
Prof. Associado João Carlos Callera Coordenador da CEUA CEUA Coordinator	

ANEXO B

Os dados apresentados na dissertação serão submetidos na Scientific reports (Qualis A1 e Fator de Impacto 4.379).

