



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira

**Avaliação reparacional óssea peri-implantar de ratas osteoporóticas
submetidas à instalação de implantes funcionalizados com anti-
esclerostina: estudo translacional**

Relatório de Pós-doutorado, realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Odontologia, Araçatuba-SP.

Supervisora: Prof^a. Associada Roberta Okamoto

CNPq: 166709/2020-4

Araçatuba

2024

Pós-Doutorado

Título: Avaliação reparacional óssea peri-implantar de ratas osteoporóticas submetidas à instalação de implantes funcionalizados com anti-esclerostina: estudo translacional

***Title:** Evaluation of peri-implant bone repair in osteoporotic rats submitted to the implant placement functionalized with anti-sclerostin: translational study*

Aluno de Pós-Doutorado: Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira (Aluno do programa de Programa de Pós-graduação em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, nível pós-doutorado, promovido pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – UNESP).

Supervisora: Prof^a. Associada Roberta Okamoto (Doutora em Ciência, Área de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; Professora do Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia, promovido pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP).

Araçatuba

2024

Resumo

Este trabalho teve com objetivo investigar a ação de uma droga anabólica óssea anti-esclerostina (Scl-Ab) de forma local através da funcionalização da superfície dos implantes. Para tanto, ratas Wistar adultas jovens, fêmeas (n=8 para cada grupo) foram divididas nos seguintes grupos: SHAM - Cirurgia fictícia; OVX - Ovariectomia bilateral; SHAM Scl-Ab - Cirurgia fictícia e instalação dos implantes funcionalizado com Scl-Ab; OVX Scl-Ab - Ovariectomia e instalação dos implantes funcionalizado com Scl-Ab. A eutanásia dos animais aconteceu aos 28 dias após a instalação dos implantes, nos animais um lado foi reservadas para realização das análises biomecânica (contra-torque) e PCR-tempo real (expressão dos genes OPG, RANKL, IBSP, OCN e ALP) e do lado contralateral, reservadas para análises dos cortes calcificados, após a administração de fluorocromos na dose de 20 mg/kg (calceína aos 14 dias e alizarina, aos 24 dias após a instalação dos implantes) e MicroCT. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis e paramétricos pelo teste ANOVA 1 ou 2 fatores. Como pós-teste, os testes de Tukey foram aplicados, com nível de significância a 5%. Para os parâmetros microtomográficos referente a volume, qualidade e BIC 3D(BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Conn. Density e IS) todos resultados não obtiveram estatística significante ($p>0,05$). Para AON ($p<0,05$) e ELCOI ($p>0,05$) a funcionalização do implante elevou a regeneração óssea local do animal SHAM e OVX. No Rt-PCR foram encontrados para IBSP e ALP, maior resultado para SHAM Scl-Ab. Já o menor resultado encontrado foi para o grupo OVX. Porém resultados mais aproximados foram encontrados para SHAM e OVX Scl-Ab, o qual não houve resultado estatisticamente significante na comparação entre estes dois (ANOVA, $p>0,05$). Sendo assim, a funcionalização do implante com Scl-Ab apresenta melhora em alguns parâmetros e semelhanças em outros sendo assim necessários mais estudos sobre o tratamento de funcionalização com esta medicação.

Palavras chave: Osteoporose, osseointegração, implante dentário.

Abstract

This study aimed to investigate the action of an anti-sclerostin bone anabolic drug (Scl-Ab) locally through the functionalization of the implant surface. For this purpose, young adult female Wistar rats ($n = 8$ for each group) were divided into the following groups: SHAM - Sham surgery; OVX - Bilateral ovariectomy; SHAM Scl-Ab - Sham surgery and installation of implants functionalized with Scl-Ab; OVX Scl-Ab - Ovariectomy and installation of implants functionalized with Scl-Ab. The animals were euthanized 28 days after implant installation. One side was reserved for biomechanical analyses (counter-torque) and real-time PCR (expression of OPG, RANKL, IBSP, OCN and ALP genes) and the contralateral side was reserved for analyses of calcified sections, after administration of fluorochromes at a dose of 20 mg/kg (calcein at 14 days and alizarin at 24 days after implant installation) and MicroCT. Nonparametric data were compared by the Kruskal-Wallis test and parametric data by the 1- or 2-way ANOVA test. As a post-test, Tukey's tests were applied, with a significance level of 5%. For the microtomographic parameters related to volume, quality and 3D BIC (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Conn. Density and IS) all results did not obtain statistical significance ($p > 0.05$). For AON ($p < 0.05$) and linear BIC ($p > 0.05$) the functionalization of the implant increased the local bone regeneration of the SHAM and OVX animals. In the Rt-PCR, the highest result was found for IBSP and ALP for SHAM Scl-Ab. The lowest result found was for the OVX group. However, closer results were found for SHAM and OVX Scl-Ab, which did not have a statistically significant result in the comparison between these two (ANOVA, $p > 0.05$). Therefore, the functionalization of the implant with Scl-Ab presents improvement in some parameters and similarities in others, thus requiring further studies on the functionalization treatment with this medication.

Key-Word: Osteoporosis, Osseointegration, Dental Implantation

1. Introdução

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica multifatorial, caracterizada pela perda óssea progressiva, acarretada pelo processo de desequilíbrio e/ou desacoplamento da atividade de remodelação óssea. Como consequência, observa-se a deterioração da microarquitetura óssea decorrendo em fraturas em locais como o fêmur, rádio e coluna lombar. Estas fraturas estão frequentemente associadas ao aumento da morbidade e mortalidade (1). Esta alteração sistêmica é classicamente reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa (2,3).

Em revisão, Tella e Gallagher (2014) (4) realizaram um levantamento sobre os tipos de tratamentos referentes à osteoporose, podendo ser através do uso de agentes farmacológicos ou não. A terapia farmacológica pode ser classificada através de agentes antirreabsortivos e anabólicos. Os bifosfonatos, moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) e denosumab constituem o grupo de antirreabsortivos. Já o paratormônio (PTH) e romosozumabe (Scl-Ab) pertencem ao grupo de agentes anabólicos, que favorecem a neoformação óssea (5). Apesar da ampla gama de opções disponíveis comercialmente, as medicações classificadas como antirreabsortivas, da classe dos bifosfonatos ainda se mantém como a primeira escolha para a terapia anti-osteoporose (6). Dados clínicos mostram que sua resposta antirreabsortiva é incontestável, no entanto, para a odontologia ainda há ressalvas quanto a sua utilização, especialmente pela ocorrência das osteonecrose dos maxilares causadas por medicações e dentre elas, o bifosfonato ocupa posição de destaque (7).

Porém uma nova medicação anabólica óssea, inibidora de esclerostina (Scl-Ab) está disponível no mercado, o Romosozumabe (Evenity™, Amgen, Thousand Oaks, California, EUA). Aprovada pela Food and Drugs Administration (FDA) no dia 9 de abril de 2019,(18) a mesma atua diretamente na via WNT, inibindo a esclerostina e fazendo com que aconteça a sinalização da formação óssea facilitada. Sua ação leva a ligação da WNT da via β -catenina, a qual causa a fosforilação da β -catenina e como consequente sinalização para formação óssea.(8-10) Esse é um importante motivo para avaliação desta medicação, no modelo de implantes dentários, uma vez que já foi evidenciado que a via Wnt/betacatenina está envolvida em melhores respostas reparacionais do tecido ósseo em alvéolos pós exodônticos e peri-implantar.(11,12, 13)

Mesmo esta medicação apresentando resultados promissores quando usada sistemicamente, algumas precauções devem ser levadas em consideração uma vez que a mesma pode aumentar o risco de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, e problemas cardiovasculares, além de alergias graves, fraturas incompletas da cabeça do fêmur, hipocalcemia e osteonecrose nos ossos maxilares (7). Por este motivo uma anamnese minuciosa do paciente deve ser realizada antes da eleição desta medicação, buscando histórico de problemas cardiovasculares, se há quadro prévio de hipocalcemia, ou problemas renais.(7)

Estudos animais prévios mostram que seis horas após a administração de Scl-Ab, há um aumento significativo nos genes da matriz extracelular no revestimento ósseo, (14) além de ser capaz de ativar células de revestimento, levando à formação óssea sem uma reabsorção prévia (modelagem), (15) esses processos tem como consequência o aumento da formação óssea periosteal e endocortical. (16,17) Informações relevantes advindas deste mesmo modelo animal mostra que o romosozumabe (Scl-Ab), não traz risco de carcinogenicidade mesmo quando usado em altas doses (50mg/kg/semana) (18). Há relatos da possibilidade de desenvolver osteonecrose mandibular (7), porém em um estudo com ratos utilizando o modelo de periodontite que induz a este problema, o Scl-Ab não foi capaz de causar osteonecrose dos maxilares nestes animais osteoporóticos, diferente do resultado encontrado quando os animais foram medicados com zolendronato (19)

A avaliação reparacional em fratura de fêmures no modelo de ratas osteoporóticas mostrou melhora quando administrado Scl-Ab subcutâneo, tanto no que diz respeito ao aumento da massa óssea quando a neoformação óssea na região das fraturas.(20) Através da reprodução do modelo de implantes femorais, pode ser notar que o Scl-Ab sistêmico parece ser uma estratégia útil nas cirurgias de substituição total da articulação quando a massa óssea é deficiente. (21) Além disso, modelos que envolvem manutenção e ganho de volume e qualidade óssea relacionado a ossos longos (22,23) e vértebras (19, 22, 24) mostram o potencial anabólico capaz de prover melhora nos quadros de osteoporose em animais com esta condições levando a normalidade óssea no que diz respeito a volume, qualidade óssea e densidade.

No reparo alveolar de ratas osteoporóticas, o Scl-Ab mostra ser capaz de preservar o osso existente, além de aumentar a quantidade de osso novo através da baixa reabsorção e alta neoformação que esta medicação promove.(25) Isto pode ser avaliado também no modelo de reparo ósseo peri-implantar o qual esta medicação é eficaz na prevenção da

perda de implantes sendo uma alternativa promissora na tentativa de minimizar os casos de osteólise peri-implantar.(26) Esta medicação é ainda capaz de mudar a arquitetura e volume ósseo na região peri-implantar após tratamento sistêmico aumentando a fixação mecânica de implantes em modelo de ratos.(27)

Assim como a teriparatida (PTH 1-34) apresenta seu efeito reduzido após dois anos de uso, (28) com a utilização do romosozumabe acontece o mesmo, porém após 12 meses, acarretando na diminuição da ação do fármaco, sendo assim, recomendado pela empresa a não utilização após este período.(7)

Neste contexto, estudos presentes na literatura vigente sobre o Scl-Ab, mostram sua competência na formação óssea, além de melhorar o osseointegração de implantes promovendo maior extensão linear de contato osso-implante,(21, 26, 27, 29) porém nada é explanado a respeito ao processo de regeneração peri-implantar quando administrada esta medicação de forma local, mesmo havendo o encorajamento da realização dos testes locais para que haja o *delivery* desta substancia e então avaliar a resposta reparacional.(29)

Tendo em vista que o Scl-Ab é uma medicação disponível para o uso em humanos a pouco tempo (romosozumabe), o qual ainda não foi testado topicamente a fim de melhorar o desempenho no reparo peri-implantar de forma local, temos a proposta de avaliar a ação do Scl-Ab, buscando, neste momento, caracterizar as respostas iniciais do tecido ósseo peri-implantar quanto aos eventos formação, reabsorção e mineralização óssea em ratas osteoporóticas através de análises microestruturais e biomecânica.

Hipótese

H0 (hipótese nula) - não haverá diferença entre os grupos para análise de extensão linear de contato osso/implante.

2. Materiais e Métodos

2.1 Funcionalização dos implantes

Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil), com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama.

Após os testes de dose com a Scl-Ab, foram realizadas as funcionalizações da superfície dos implantes. Para isto, os implantes foram isolados e esterilizados em raio UV. A solução foi feita utilizando 10 μ l de Scl-Ab para 990 μ l de água destilada, diluída em 100ml de dimetilsulfóxido, no qual foram realizados 5 banhos (**Figura 1**).



Figura 1 – Etapa de banho dos implantes com a solução a base de Scl-Ab.

3.1 Número amostral e Delineamento experimental

O número amostral do presente estudo para cada grupo foi determinado usando o *power test* através do website <http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm> (OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto), baseado em resultados prévios já publicados (13): as médias utilizadas para o cálculo foram 3,06 e 4,898 e os desvios padrões foram 0,26 e 0,024, com nível de significância de 5% e poder de 95% em um teste de hipótese unicaudal.

A linha do tempo englobando os procedimentos experimentais que foram realizados pode ser visualizada na **figura 2** e na **tabela 1**. Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, submetidas a cirurgia de ovariectomia para indução a osteoporose, as quais receberam implantes funcionalizados com Scl-Ab nas tíbias. As análises propostas para este estudo serão divididas em análises dos cortes calcificados, e microCT (tíbias esquerdas), análise biomecânica e por biologia molecular (tíbias direita). Os grupos SHAM e OVX foram considerados os grupos controles positivo e negativo, respectivamente, para comparação aos demais grupos. Estes dois grupos receberam implantes convencionais e foram usados para comparação com os grupos submetidos ao tratamento com Scl-Ab local. O grupo SHAM Scl-Ab foram os animais

saudáveis que receberão os implantes funcionalizados com Scl-Ab, já OVX Scl-Ab receberam os mesmos implantes funcionalizados, porém os animais foram submetidos a ovariectomia previamente.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais que foram realizadas as avaliações peri-implantares com utilização do Scl-Ab sistêmico e local, mediante as análises.

<i>Grupos</i>	<i>Biomecânica RT-PCR-rt (Tibia Dir)</i>	<i>Calcificado, MicroCT (Tibia Esq)</i>	<i>(N) Total</i>
SHAM	8	8	8
OVX	8	8	8
SHAM Scl-Ab	8	8	8
OVX Scl-Ab	8	8	8

SHAM = Cirurgia fictícia, apenas exposição dos ovários das ratas e instalação de implantes convencionais; **OVX** = Ovariectomia bilateral e instalação de implantes convencionais; **OVX SHAM Scl-Ab** = Cirurgia fictícia e instalação dos implantes funcionalizados com Scl-Ab pela técnica LBL; **OVX Scl-Ab** = Ovariectomia e instalação dos implantes funcionalizado com Scl-Ab pela técnica LBL.

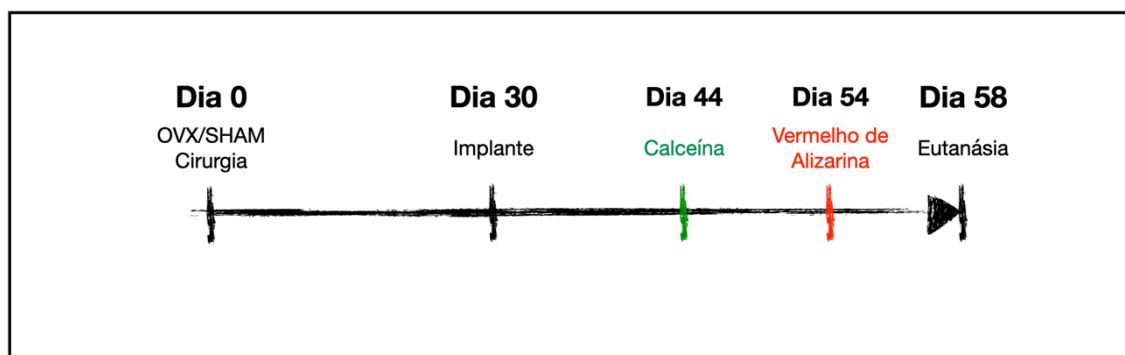


Figura 2 – Desenho experimental do projeto referente aos procedimentos e a cronologia.

No tempo zero, as ratas selecionadas para o experimento foram submetidas a cirurgia fictícia ou cirurgia de ovariectomia bilateral. Passados 30 dias ($t=30$), foram feitas as instalações dos implantes osseointegráveis nas tíbias desses animais. Quatorze dias após as cirurgias de instalação dos implantes ($t = 44d$), todos os grupos experimentais receberam a injeção intramuscular de Calceína (20mg/kg) e dez dias após o início do tratamento medicamentoso ($t = 54d$) os mesmos animais receberam injeção intramuscular de alizarina (20mg/kg). As injeções dos fluorocromos objetivam avaliar a dinâmica óssea (tecidos calcificados).

Aos 28 dias após a instalação dos implantes ($t = 58d$), os animais foram anestesiados e nas tíbias do lado direito, os implantes foram removidos utilizando o torquímetro digital, para obtenção dos dados quanto ao torque de remoção. Imediatamente após a remoção dos implantes, o tecido ósseo em contato com as espiras dos implantes foi removido para posterior realização da análise de PCR tempo real, com o intuito de avaliar a expressão relativa de genes envolvidos com o metabolismo do tecido ósseo. As tíbias do lado esquerdo foram reservadas para o escaneamento por microtomógrafo computadorizado e após o armazenamento das imagens reconstruídas e o processamento pelos *softwares* para avaliação morfométrica do tecido ósseo reparacional, elas serão incluídas em resina Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) e partidas ao meio. Estas passarão pelo processamento para histologia de tecidos calcificados, (análise dos fluorocromos) e posteriormente a coloração por Vermelho de alizarina e azul de stevenel (**Tabela 1 e Figura 2**).

3.2.1 Animais

Os procedimentos executados no presente projeto foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição, para então dar-se início aos experimentos propostos. As ratas, ao início do experimento, tinham a idade de 4 meses, foram mantidas em biotério climatizado e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas e receberam ração de composição nutricional balanceada e água *ad libitum*.

3.2.1.1 Ciclo estral

Para garantir que as ratas selecionadas para os experimentos estavam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foi aspirado e colocado em lâmina histológica para leitura microscópica imediata (técnica de Long & Evans, 1922 (43) 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 Cirurgias

3.2.2.1 Ovariectomia

As ratas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, foi realizada uma incisão de 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, foram localizados os ovários e os cornos uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi realizada a remoção dos ovários. Finalizado, feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). As ratas do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém foram apenas realizada a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção (**figura 3**).

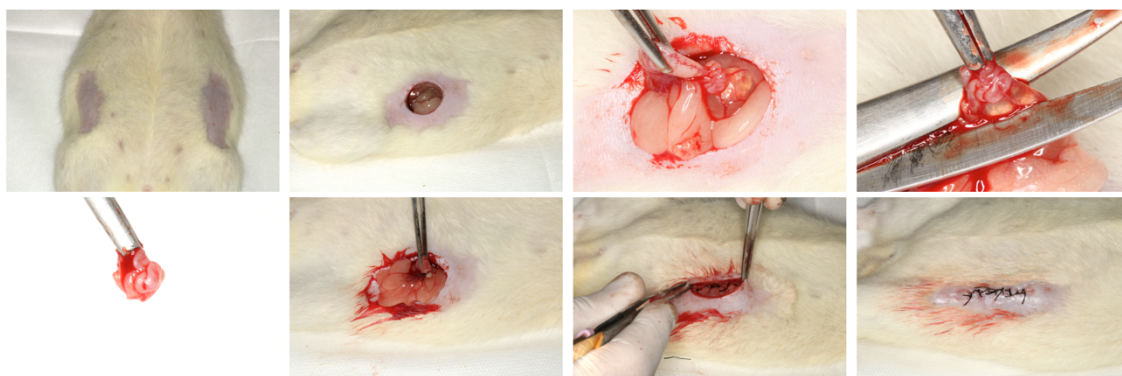


Figura 3 - Cirurgia de Ovariectomia dos animais que receberam os implantes.

3.2.2.2 Técnica para instalação dos implantes

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 dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo,

Japão) foi realizada uma incisão 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 receber os implantes.

Foram instalados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil), com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,6 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), com travamento e estabilidade inicial (**Figura 4**).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Os tecidos serão 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.

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



Figura 4 - Imagens representativas das cirurgias a serem realizadas nos animais. Antissepsia com PVPI em ambas as tíbias após tricotomia; Acesso a metáfise tibial; Fresagem e leito; Implante de 2 x 4 mm; Instalação do implante; Implante instalado em nível ósseo; Sutura.

3.2.3 Randomização na seleção das amostras que serão destinadas para as análises de tecidos calcificados ou biomecânica e PCR

Foi utilizado um software (Microsoft Excel) para que seja aleatória a distribuição das tíbias direita e esquerda de cada animal, submetidas às análises propostas (de um lado o contra torque/PCR e do outro lado a microtomografia e análise fluorocromos).

3.2.4 Processamento laboratorial para tecidos calcificados

As amostras destinadas a análise de tecidos calcificados foram fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e foram imersas em álcool 70%, para que seja realizado o escaneamento pelo microtomógrafo computadorizado. Após a obtenção das imagens reconstruídas tridimensionalmente, estas mesmas amostras passarão pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias. Ao término da desidratação, as peças serão imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilize apenas a resina como meio de imersão. As peças serão incluídas na resina Technovit, que será fotopolimerizada e passarão pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha).

O corte e o desgaste das peças serão realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte Exakt (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha), serão montada em lâminas de vidro, lixadas e polidas até a obtenção de secção de aproximadamente 80 μ m de espessura. Estas lâminas serão analisadas em microscopia confocal (para avaliação dos fluorocromos) e posteriormente, será realizada a coloração por vermelho de alizarina e stevenel blue, as mesmas serão analisadas em microscopia de luz (para a análise histométrica estática).

3.2.5 Análises

3.2.5.1 Análise biomecânica (torque reverso dos implantes)

Para a análise biomecânica, os animais foram sedados com cloridrato de quetamina e xilazina e as tíbias acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um montaimplante (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital acoplado ao monta-implante.

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

3.2.5.2 Análise molecular (PCR tempo real)

Após a realização do torque reverso, imediatamente as tíbias foram removidas e reduzidas com disco de aço montado em baixa rotação, respeitando pelo menos 0,5 cm em cada face do espaço peri-implantar, preservando este osso que estava em contato com as espiras dos implantes.

A reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão gênica de marcadores relacionados ao processo de reparo ósseo ao redor dos implantes.

Cada fragmento ósseo foi cuidadosamente lavado em PBS e posteriormente congelado em nitrogênio líquido para que o RNA total fosse extraído com o reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a análise da integridade, pureza e concentração do RNA, foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA através da reação de transcriptase reversa (M-MLV transcriptase reversa: Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os cDNAs das amostras foram pipetados juntamente com o Taqman Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems) na placa para PCR (96 well fast thermal cycling, Life Biotechnologies) para detecção de genes envolvidos no processo de reparo ósseo (Taqman Gene Expression Assays). Os genes estudados foram os que codificam Osteoprotegerina (OPG), RANKL, IBSP, Osteocalcina (OCN), Fosfatase Alcalina (ALP). O PCR em tempo real foi realizado num sistema de detecção para PCR em tempo real Step One Plus (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pela curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à expressão das proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos ósseos dos alvéolos em reparação dos diferentes períodos experimentais (método $\Delta\Delta CT$). O ensaio foi feito em quadruplicata.

3.2.5.3 Avaliação microtomográfica (Micro-Ct)

As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras serão armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003- 11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. Esta área ficou definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershold). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitará a obtenção do percentual de volume ósseo (BV/TV) formado ao redor dos implantes. Também foram avaliados parâmetros que caracterizam o trabeculado ósseo, como espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número (Tb.N) e separação (Tb.S) entre as trabéculas ósseas, além da intersecção de superfície (IS) e densidade de conectividade. Vale destacar que as imagens obtidas a partir da microtomografia computadorizada também foram utilizadas para caracterizar o osso em cada um dos grupos experimentais, utilizando o software CTanalyser (44).

3.2.5.4 Microscopia Confocal (histometria dinâmica peri-implantar)

Após a realização das microtomografias, as peças retornaram para o término do processamento laboratorial dos tecidos calcificados, como descrito anteriormente, até a inclusão em resina Techno Vit® e obtenção das lâminas, após o corte e polimento.

A partir da obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópico confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens obtidas a partir de diferentes secções das amostras na região ao redor dos implantes, foram comprimidas a fim de obter o melhor ajuste. Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitirá obter o melhor ajuste de imagens que representará a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens começaram desde o começo da fluorescência, o que representará na nossa metodologia, o início da calcificação

(precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens tiveram a dimensão de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ e corresponderão a secções óticas de 512 por 512 pixels. Secções de $2 \mu\text{m}$ foram escaneadas por 2,5min. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada $56 \mu\text{m}$ de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação do “double dichroic” 488/568 nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representarão os filtros que permitiram visualizar os fluorocromos. Um dos filtros possibilita a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstituídas através da pilha de software que está instalado para manipular o microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

O osso alveolar (peri-implantar) apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa uma sobreposição de cálcio que precipitará em cada um dos períodos, assim mostrando a conversão de osso antigo para osso novo. Essas imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada). Usando a ferramenta “color *threshold*”, cada imagem foi padronizada de acordo com atonalidade, saturação, e brilho a fim de revelar primariamente os fluorocromos. Primeiro, a calceína foi destacada, e a ferramenta “*measure*” foi usada para prover a área em μm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. O *turnover* ósseo, nessa abordagem metodológica, foi representado pela diferença entre osso antigo (verde) e osso novo (vermelho).

A partir das quantificações das áreas dos fluorocromos, relacionadas à densidade de superfície (parâmetro obtido a partir da análise microtomográfica) foi realizado o cálculo da superfície ativa de mineralização (área de precipitação do último fluorocromo injetado, no caso, a alizarina). A partir da quantificação da distância entre as faixas de fluorocromos, relacionando com a diferença de dias entre cada injeção, foi possível calcular a taxa de deposição mineral diária. A partir destes dois parâmetros, também foram calculados outros valores dinâmicos de precipitação mineral e que representam o volume ósseo, a superfície mineralizada, a taxa de formação óssea e a extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) (45).

3.3 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma 8.1.1. A análise da homocedasticidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste one-way ANOVA foi usado para avaliação de todos parâmetros de biomecânica, PCR, Micro-CT, além de MAR (deposição mineral óssea diária), ELCOI (extensão linear osso/iplante) e AON (área de osso neoformada) referentes a mensuração dos fluorocromos sobrepostos, e quando necessário o pós-teste de Tukey. Para análise dos dados referente a área de fluorocromos o teste two-way ANOVA foi utilizado. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultado

4.1 Análise biomecânica

Durante a eutanásia foi realizada a análise de contra torque para, na qual obtivemos o resultado do valor médio para SHAM de 8,25 n.cm, OVX 6 n.cm, SHAM Scl-Ab/Loc 9,15n.cm e OVX Scl-Ab/Loc 6,6n.cm. Foi possível notar que os grupos SHAM e SHAM Scl-Ab/Loc não teve resultado estatisticamente significante na comparação de ambos, assim como aconteceu na comparação entra OVX e OVX Scl-Ab/Loc. Já na comparação entre OVX x SHAM (Tukey, $p = 0,0371$), OVX Scl-Ab/Loc x. SHAM (Tukey, $p = 0,0391$), OVX x SHAM Scl-Ab/Loc (Tukey, $p = 0,0059$), OVX Scl-Ab/Loc x SHAM Scl-Ab/Loc (Tukey, $p = 0,0062$), houveram resultados estatisticamente significante (**figura 5**).

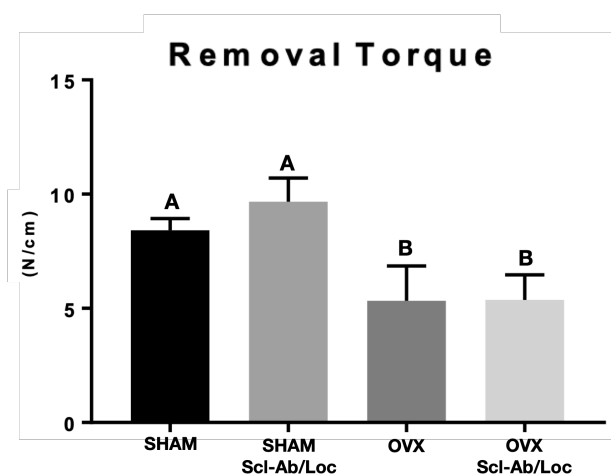


Figura 5 – Resultado do torque reverso dos grupos OVX e SHAM, avaliação da comparação dos grupos que receberam ou não o tratamento de superfície com Scl-Ab (Letras diferentes = $p < 0,05$).

4.2 RT-PCR

Para todos os parâmetros avaliados no RT-PCR o grupo SHAM foi considerado o padrão recebendo o valor fixo de 1 e os demais foram avaliados através desta referência.

Para a expressão genética relativa de OPG, foi possível observar maiores valores para o grupo SHAM Scl-Ab (1,273), seguido por SHAM (1,007). Os grupos OVX e OVX Scl-Ab apresentaram os menores resultados, com 0,1447 e 0,0426 respectivamente. Na comparação entre os diferentes grupos, todos os resultados foram estatisticamente significantes (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6A**).

Para RANKL, a expressão genética relativa dos grupos SHAM, SHAM Scl-Ab, OVX e OVX Scl-Ab foram respectivamente 0,9967; 1,277; 0,042 e 0,162. Foi possível notar resultado estatisticamente significativo na comparação entre todos os grupos (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6B**).

A expressão genética relativa de IBSP, apresentou valores próximos para os grupos SHAM (1,0) e OVX Scl-Ab (0,853), os quais não obtiveram resultados estatisticamente significante nas comparações (ANOVA, $p > 0,05$). A maior expressão genética relativa encontrado, foi para o grupo SHAM Scl-Ab (1,999), e a menor foi para OVX (0,1326), resultados estes que foram estatisticamente significante na comparação entre eles e com os demais grupos (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6C**).

Para OCN, a expressão genética relativa de todos os grupos quando comparados apresentaram resultado estatisticamente significativo (Tukey, $p < 0,05$), sendo estes: SHAM (1,0), SHAM Scl-Ab (1,892), OVX (0,2994) e OVX Scl-Ab (0,5026) (**Figura 6D**).

Assim como a IBSP, um padrão relevante foi encontrado na comparação entre os grupos para ALP, em que o maior resultado encontrado foi para SHAM Scl-Ab (2,438). Já o menor resultado encontrado foi para o grupo OVX (0,4582). Porém resultados mais aproximados foram encontrados para SHAM e OVX Scl-Ab, sendo 1,002 e 1,032 respectivamente (SHAM e OVX Scl-Ab x OVX x SHAM Scl-Ab: Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 6E**).

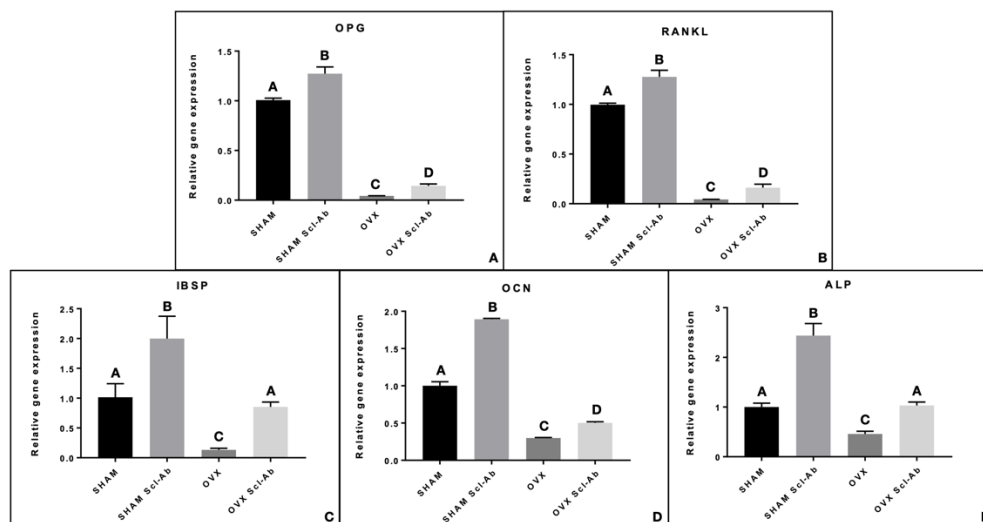


FIGURA 6 – Expressão genética relativa de OPG (A), RANKL (B), IBSP (C), OCN (D) e ALP (E) nos grupos SHAM, SHAM Scl-Ab, OVX e OVX Scl-Ab (Letras diferentes = $p < 0,05$).

4.3 Micro-CT

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente a medida da porcentagem de volume óssea (BV/TV), foi encontrado os seguintes resultados para o grupo SHAM, SHAM Scl-Ab/Loc, OVX e OVX Scl-Ab/Loc: 54,75%, 64,59%, 61,12% e 59,84% respectivamente ($p > 0,05$) (**Figura 7A**).

Referente as trabéculas ósseas peri-implantares, a espessura trabecular (Tb.Th) mostrou resultados aproximados entre todos os grupos tanto SHAM quanto OVX, obtendo os seguintes resultados: SHAM (0,054 mm), SHAM Scl-Ab/Loc (0,056 mm), OVX (0,058 mm), OVX Scl-Ab/Loc (0,058 mm), sem diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 7B**). Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido para os grupos OVX e SHAM respectivamente uma média de 9,89/mm e 10,47/mm, para SHAM Scl-Ab/Loc e OVX Scl-Ab/Loc 11,26/mm e 10,15/mm ($p > 0,05$) (**Figura 7C**). E o padrão encontrando para a separação das trabéculas (Tb.Sp), foi o resultados aproximados entre todos grupos SHAM (0,052 mm), SHAM Scl-Ab/Loc (0,047 mm), OVX (0,052 mm), OVX Scl-Ab/Loc (0,049 mm) ($p > 0,05$) (**Figura 7D**).

Em relação a Densidade de Conectividade (Conn. Dn), os valores foram de 3566,84/mm³ (SHAM), 2818,01/mm³ (SHAM Scl-Ab/Loc), 2561,76/mm³ (OVX) e 2678,47/mm³ (OVX Scl-Ab/Loc) ($p > 0,05$) (**Figura 7E**).

Já a interseção entre osso e implante, ou seja, o contato presente entre o osso e implante (BIC), foi possível avaliar tridimensionalmente uma área relativamente semelhante entre os grupos com: 19,64 mm³ (SHAM), 25,37 mm³ (SHAM Scl-Ab/Loc), 23, 86mm³ (OVX) e 25,21 mm³ (OVX Scl-Ab/Loc), não havendo diferença estatisticamente significantes na comparação entre os grupos ($p>0,05$) (**Figura 7F**).

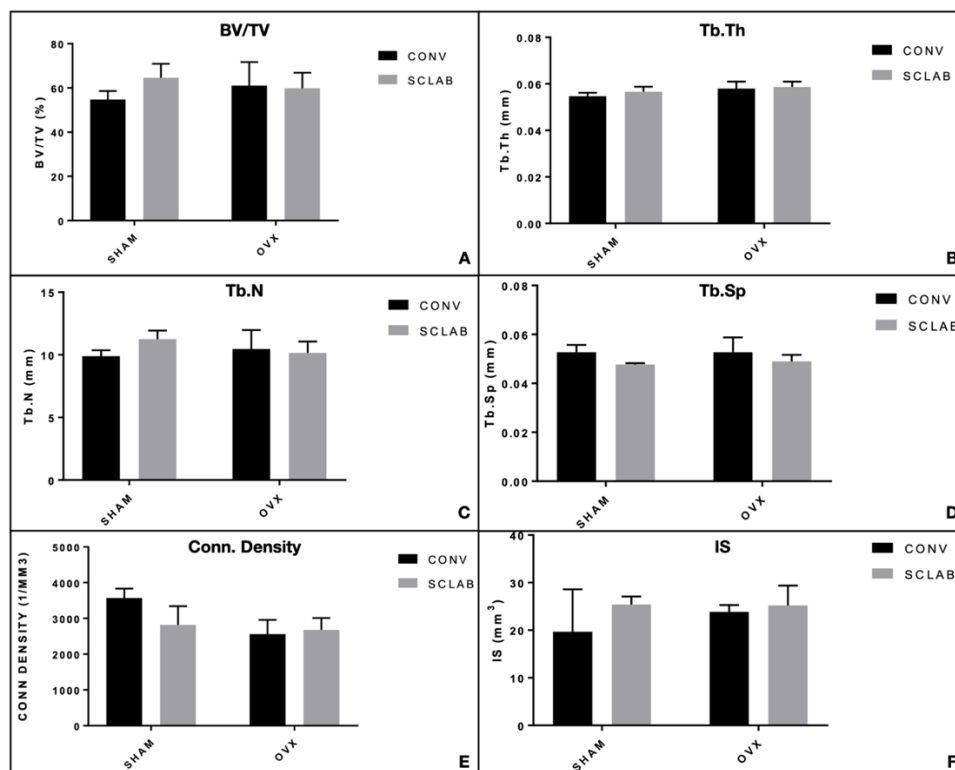


FIGURA 7 – Quantificação dos padrões microfotográficos através da BV/TV (A), Tb.Th (B), Tb.n (C), Tb.Sp (D), Conn. Density (E), IS (F). Para todas análises $p>0,05$.

4.4 Microscopia Confocal à Laser

Os fluorocromos serviram para marcação da matriz de cálcio, através da calceína (verde) e alizarina (vermelho), demonstrando assim, a dinâmica do osso peri-implantar durante o reparo do defeito nos grupos experimentais. Isto permitiu as avaliações de dinâmica óssea, e deposições de cálcio diárias, além da área de neoformação óssea.

Na comparação entre os diferentes grupos, a media dos resultados obtidos mostrou o maior resultado numérico para os grupos SHAM (calceína) e SHAM Scl-Ab (Calceína) sendo estatisticamente significante na comparação com os demais grupos (Tukey, $p<0,05$) (**Figura 8A**).

Na avaliação da deposição mineral óssea diária (MAR) os resultados encontrados foram: 3,37 μm (SHAM), 4,03 μm (SHAM Scl-Ab), 2,50 μm (OVX) e 2,1 μm (OVX Scl-Ab). Após a análise estatística foi possível avaliar um padrão que mostrou um aumento na deposição mineral diária causada da Scl-Ab tópico nos animais osteoporóticos somente no SHAM, em que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos OVX e OVX Scl-Ab (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 8B**).

No contexto de neoformação óssea na sobreposição das imagens em relação ao osso velho e novo juntos, foi possível observar resultados mais favoráveis no que se diz respeito neoformação óssea peri-implantar nos ratos saudáveis tratados com Scl-Ab tópico (SHAM Scl-Ab – 33884 μm^2), o qual apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos (Tukey, $p > 0,05$). Além disso foi possível notar expressiva melhora na neoformação óssea em relação aos grupo OVX (9220 μm^2), quando o Scl-Ab foi adicionado a superfície (OVX Scl-Ab – 13495 μm^2) obtendo também resultado estatisticamente significativo nesta comparação (Tukey, $p = 0,0411$) (**Figura 8C**).

Para a extensão linear de contato osso/implante, os resultados obtidos para SHAM (521,1 μm) foram menores do que SHAM Scl-Ab (659,6 μm), porém na comparação entre esses dois grupos não houve resultado estatisticamente significativo (ANOVA, $p > 0,05$). O mesmo padrão aconteceu para OVX (312,6 μm) em relação OVX Scl-Ab (314,8 μm) em quem a funcionalização do Scl-Ab melhorou o resultado, mas não houve estatística significativa na comparação destes dois grupos (ANOVA, $p > 0,05$). Já a comparação de SHAM e SHAM Scl-Ab em relação tanto a OVX quanto OVX Scl-Ab houve significância estatística (Tukey, $p < 0,05$) (**Figura 8D**).

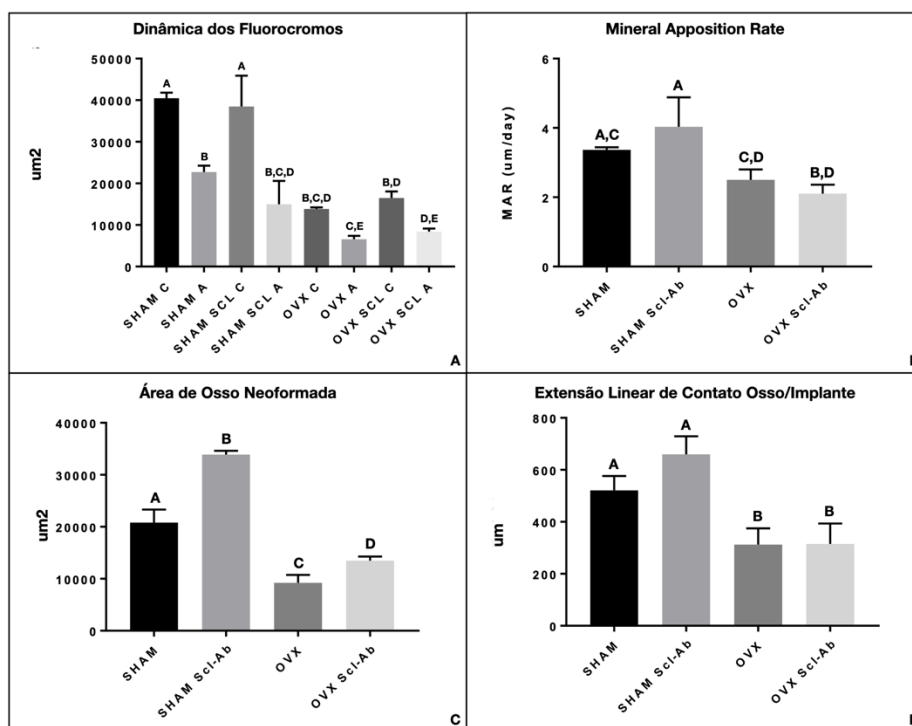


FIGURA 8 A-E - - Quantificação dos padrões microscopia confocal a laser através da Dinâmica de Fluorocromos (A), Mineral Apposition Rate (B), Área de Osso Neoformada (C) e Extensão Linear de Contato Osso/Implante (D) (Letras diferentes = $p < 0,05$).

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos quantitativos de um agente formador de osso, Scl-Ab funcionalizado na superfície de implantes, sendo avaliado a nível de tecido e expressão genética relativa; especificamente, em ratas fêmeas saudáveis e ratas fêmeas ovariectomizadas (osteopênicas).

A esclerostina (Scl-Ab) está disponível no mercado e é fornecida pelo nome comercial de Romosozumabe (Evenity™, Amgen, Thousand Oaks, California, EUA). Atuando diretamente na via WNT, inibindo a esclerostina esta droga faz acontecer a sinalização da formação óssea facilitada. Sua ação leva a ligação da WNT da via β -catenina, fosforilando a β -catenina e levando assim a formação óssea.(8-10) Esse é um importante motivo para avaliação desta medicação, no modelo de implantes dentários, uma vez que já foi evidenciado que a via Wnt/betacatenina está envolvida em melhores respostas reparacionais do tecido ósseo em alvéolos pós exodônticos e peri-implantar.(11,12, 13)

O conceito de que a expressão local da esclerostina limitará os tecidos respondentes àqueles que expressam esclerostina é confirmado nos estudos de toxicidade

crônica e ao longo da vida. Todas as descobertas foram uma consequência direta ou indireta dos efeitos farmacológicos no osso, o que confirma o osso como o tecido-alvo primário onde os efeitos biológicos da inibição da esclerostina pelo romosozumabe são evidentes. Esses dados também são consistentes com o fenótipo específico do osso de mutações com perda por ausência de função em humanos e camundongos. A falta de achados em outros tecidos que expressam esclerostina em ratos pode ser uma consequência do acesso limitado de Scl-Ab à célula-alvo (por exemplo, condrócitos) ou mecanismos regulatórios redundantes. Os achados específicos do osso contrastam com a patologia observada com um inibidor da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) que ativa amplamente a sinalização Wnt canônica ao impedir a degradação da b-catenina. A inibição da GSK resulta em alterações hiperplásicas em vários tecidos moles em ratos e cães (46), consistentes com alterações hiperplásicas que ocorrem com a superexpressão de ligantes Wnt em tecidos selecionados (47).

Embora o romosozumabe seja um agente de construção óssea, a administração ao longo da vida não resultou em alterações ósseas pré-neoplásicas dependentes da dose e tumores ósseos benignos e malignos que foram observados com outros agentes de construção óssea em ratos, especificamente PTH e análogos relacionados (48).

Estudos vigentes mostraram que a Scl-Ab podem leva a uma melhorar o osseointegração de implantes promovendo maior extensão linear de contato osso-implante,(21, 26, 27, 29) porém nada foi encontrado a respeito ao processo de regeneração peri-implantar quando realizada a funcionalização de implantes com a utilização da mesma de forma local. O encorajamento da realização dos testes locais através da disponibilidade de Scl-Ab com o *delivery* desta substancia existe para avaliar a resposta reparacional, (29) por este motivo o presente estudo traz resultados mostrando os testes realizados desta maneira.

Quando analisados os resultados da sua utilização tópica na análise de contra torque foi possível perceber uma resultados numéricos maiores para SHAM Scl-Ab em relação ao grupo SHAM e o mesmo aconteceu para o grupo OVX Scl-Ab em comparação ao OVX, porém ambos sem resultados estatisticamente significante (ANOVA, $p>0,05$). Este mesmo padrão foi notado para a extensão linear de contato osso/implante- ELCOI, também sem resultados estatisticamente significante (ANOVA, $p>0,05$) quando avalido pela análise de microscopia confocal a laser, já na análise de área de osso neoformada – AON o resultados seguiu este padrão, porém com resultado estatisticamente significante nas comparações (Tukey, $p<0,05$), mostrando assim melhora expressiva na formação do

volume de osso formado ao redor das espiras dos implantes quando o implante foi funcionalizado com Scl-Ab tanto para os animais saudáveis (SHAM) quando para os animais osteopênicos (OVX).

Resultados relativos a expressão genética promissores foram encontrados para IBSP e ALP, em que o maior resultado encontrado foi para SHAM Scl-Ab. Já o menor resultado encontrado foi para o grupo OVX. Porém resultados mais aproximados foram encontrados para SHAM e OVX Scl-Ab, o qual não houve resultado estatisticamente significativo na comparação entre estes dois (ANOVA, $p > 0,05$). Isso mostra que a expressão genética relativa estava presente para o grupo osteopênico quando adicionado Scl-Ab na superfície de seus implantes levando a um estímulo semelhante ao presente no SHAM, trazendo assim uma analogia de semelhança entre o animal osteopênico tratado e o saudável sem tratamento.

Os resultados do presente trabalho, mostra que em alguns parâmetros há melhora do reparo peri-implantar quando adicionado o anabólico ósseo Scl-Ab nos animais saudáveis e osteopênicos, e quem há em alguns parâmetros até a semelhança entre o animal saudável sem tratamento e o osteopênico tratado. Porém é nítido que mais estudos com a funcionalização de materiais ou utilização tópica do Scl-Ab são necessários.

6. Bibliografia

1. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(2):99-105.
2. Drake MT, Khosla S. Male osteoporosis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2012;41(3):629-41.
3. Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocrine reviews*. 2008;29(4):441-64.
4. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;142:155-70.
5. Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*. 2015 Mar 20;10:583-91. doi: 10.2147/CIA.S54614. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 25848234; PubMed Central PMCID: PMC4374649.
6. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031. Epub 2014 May 5. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;73(9):1879. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jul;73(7):1440. PubMed PMID: 25234529.
7. Choy M. Pharmaceutical Approval Update. *P T*. 2019 Jul;44(7):405-435. PubMed PMID: 31258309; PubMed Central PMCID: PMC6590926.
8. Hussar DA, Helms HE. Romosozumab-aqgg, upadacitinib, and risankizumab-rzaa. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2019 Nov - Dec;59(6):908-911. doi: 10.1016/j.japh.2019.09.014. PubMed PMID: 31735342.
9. Larsson S. Anti-sclerostin - is there an indication? *Injury*. 2016 Jan;47 Suppl 1:S31-5. doi: 10.1016/S0020-1383(16)30008-0. PubMed PMID: 26768288.
10. Costa S, Fairfield H, Reagan MR. Inverse correlation between trabecular bone volume and bone marrow adipose tissue in rats treated with osteoanabolic agents. *Bone*. 2019 Jun;123:211-223. doi: 10.1016/j.bone.2019.03.038. Epub 2019 Apr 4. PubMed PMID: 30954729; PubMed Central PMCID: PMC6559822.
11. de Oliveira D, de Oliveira Puttini I, Silva Gomes-Ferreira PH, Palin LP, Matsumoto MA, Okamoto R. Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchietomized rats. *Clin Oral Investig*. 2019 May;23(5):2313-2322. doi: 10.1007/s00784-018-2672-y. Epub 2018 Oct 6. PubMed PMID: 30291494.

12. de Oliveira Puttini I, Gomes-Ferreira PHDS, de Oliveira D, Hassumi JS, Gonçalves PZ, Okamoto R. Teriparatide improves alveolar bone modelling after tooth extraction in orchietomized rats. *Arch Oral Biol.* 2019 Jun;102:147-154. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.04.007. Epub 2019 Apr 16. PubMed PMID: 31022626.
13. Gomes-Ferreira PHS, de Oliveira D, Frigério PB, de Souza Batista FR, Grandfield K, Okamoto R. Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchietomized rats. *Osteoporos Int.* 2020 May 7. doi: 10.1007/s00198-020-05431-y. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32383065.
14. Nioi P, Taylor S, Hu R, Pacheco E, He YD, Hamadeh H, Paszty C, Pyrah I, Ominsky MS, Boyce RW. Transcriptional Profiling of Laser Capture Microdissected Subpopulations of the Osteoblast Lineage Provides Insight Into the Early Response to Sclerostin Antibody in Rats. *J Bone Miner Res.* 2015 Aug;30(8):1457-67. doi: 10.1002/jbmr.2482. Epub 2015 May 22. PubMed PMID: 25678055.
15. Ominsky MS, Niu QT, Li C, Li X, Ke HZ. Tissue-level mechanisms responsible for the increase in bone formation and bone volume by sclerostin antibody. *J Bone Miner Res.* 2014 Jun;29(6):1424-30. PubMed PMID: 24967455.
16. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res.* 2011 Jan;26(1):19-26. doi: 10.1002/jbmr.173. PubMed PMID: 20593411.
17. Li X, Niu QT, Warmington KS, Asuncion FJ, Dwyer D, Grisanti M, Han CY, Stolina M, Eschenberg MJ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Ominsky MS, Ke HZ. Progressive increases in bone mass and bone strength in an ovariectomized rat model of osteoporosis after 26 weeks of treatment with a sclerostin antibody. *Endocrinology.* 2014 Dec;155(12):4785-97. doi: 10.1210/en.2013-1905. Epub 2014 Sep 26. PubMed PMID: 25259718.
18. Chouinard L, Felx M, Mellal N, et al. Carcinogenicity risk assessment of romosozumab: A review of scientific weight-of-evidence and findings in a rat lifetime pharmacology study. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;81:212-222. doi:10.1016/j.yrtph.2016.08.010
19. Hadaya D, Gkouveris I, Soundia A, Bezouglaia O, Boyce RW, Stolina M, Dwyer D, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo TL, Tetradis S. Clinically Relevant Doses of Sclerostin Antibody Do Not Induce Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) in Rats with Experimental Periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2019 Jan;34(1):171-181. doi: 10.1002/jbmr.3581. Epub 2018 Sep 24. PubMed PMID: 30184271; PubMed Central PMCID: PMC6448152.
20. Liu Y, Rui Y, Cheng TY, Huang S, Xu L, Meng F, Lee WY, Zhang T, Li N, Li C, Ke H, Li G. Effects of Sclerostin Antibody on the Healing of Femoral Fractures in Ovariectomised Rats. *Calcif Tissue Int.* 2016 Mar;98(3):263-74. doi: 10.1007/s00223-015-0085-3. Epub 2015 Nov 24. PubMed PMID: 26603303.
21. Viridi AS, Irish J, Sena K, et al. Sclerostin antibody treatment improves implant fixation in a model of severe osteoporosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2015;97(2):133-140. doi:10.2106/JBJS.N.00654
22. Stolina M, Dwyer D, Niu QT, et al. Temporal changes in systemic and local expression of bone turnover markers during six months of sclerostin antibody administration to ovariectomized rats. *Bone.* 2014;67:305-13.
23. Ominsky MS, Boyce RW, Li X, Ke HZ. Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis. *Bone.* 2017 Mar;96:63-75. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.019. Epub 2016 Oct 24. Review. PubMed PMID: 27789417.
24. Ominsky MS, Brown DL, Van G, et al. Differential temporal effects of sclerostin antibody and parathyroid hormone on cancellous and cortical bone and quantitative differences in effects on the osteoblast lineage in young intact rats. *Bone.* 2015;81:380-391. doi:10.1016/j.bone.2015.08.007
25. Liu M, Kurimoto P, Zhang J, et al. Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss. *J Dent Res.* 2018;97(9):1031-1038. doi:10.1177/0022034518766874
26. Liu S, Viridi AS, Sena K, Sumner DR. Sclerostin antibody prevents particle-induced implant loosening by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a rat model. *Arthritis Rheum.* 2012;64(12):4012-4020. doi:10.1002/art.37697
27. Viridi AS, Liu M, Sena K, et al. Sclerostin antibody increases bone volume and enhances implant fixation in a rat model. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(18):1670-1680. doi:10.2106/JBJS.K.00344
28. Kendler DL, Marin F, Zerbini CAF, Russo LA, Greenspan SL, Zikan V, Bagur A, Malouf-Sierra J, Lakatos P, Fahrleitner-Pammer A, Lespessailles E, Minisola S, Body JJ, Geusens P, Möricke R, López-Romero P. Effects of teriparatide and risedronate on new fractures in post-menopausal women with severe osteoporosis (VERO): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet.* 2018 Jan 20;391(10117):230-240. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32137-2. Epub 2017 Nov 9. Erratum in: *Lancet.* 2017 Nov 30. Erratum in: *Lancet.* 2018 Dec 1;392(10162):2352.
29. Yu SH, Hao J, Fretwurst T, et al. Sclerostin-Neutralizing Antibody Enhances Bone Regeneration Around Oral Implants. *Tissue Eng Part A.* 2018;24(21-22):1672-1679. doi:10.1089/ten.TEA.2018.0013
30. Shi Q, Qian Z, Liu D, Liu H. Surface Modification of Dental Titanium Implant by Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly. *Front Physiol.* 2017 Aug 7;8:574.
31. Trino LD, Bronze-Uhle ES, Ramachandran A, Lisboa-Filho PN, Mathew MT, George A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 May;81:26-38. doi: 10.1016/j.jmbm.2018.02.024. Epub 2018 Feb 21. PubMed PMID: 29477893; PubMed Central PMCID: PMC5871601.
32. Hernandez-Montelongo J, Corrales Ureña YR, Machado D, Lancellotti M, Pinheiro MP, Rischka K, Lisboa-Filho PN, Cotta MA. Electrostatic immobilization of antimicrobial peptides on polyethylenimine and their antibacterial effect against *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018 Apr 1;164:370-378. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.02.002. Epub 2018 Feb 5. PubMed PMID: 29413618.

33. Trino LD, Dias LFG, Albano LGS, Bronze-Uhler ES, Rangel EC, Graeff CFO, Lisboa-Filho PN. Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. *Ceramics International*. 2018, Mar;44(4):4000-4008.
34. Skoog, D. A.; Holler F. J.; Crouch S. R. *Princípios de análise instrumental*, Porto Alegre: Bookman, 2009.
35. Park JW, Kim HK, Kim YJ, Jang JH, Song H, Hanawa T. Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. *Acta Biomater*. 2010 Jul;6(7):2843-51.
36. Pilz S, Gebert A, Gemming T, Janek J. Functionalization of Ti-40Nb implant material with strontium by reactive sputtering. *Biomater Res*. 2017 Oct 10;21:18.
37. Iafisco, M., Palazzo, B., Falini, G., Di Foggia, M., Bonora, S., Nicolis, S., Casella, L., Roveri, N., Adsorption and Conformational Change of Myoglobin on Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals Functionalized with Alendronate, *Langmuir*, 24, 4924-4930, 2008.
38. Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, de Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008 Mar;28(2):205-11.
39. International Standard ISO 10993-1 "Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process", Disponível em: www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance.
40. Andrade PD, Vasconcellos LM, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELS, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: in vitro study. *Mat Sci and Eng C*. 2015;56:538-44.
41. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–275.
42. do Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VA, Carvalho YR, Cairo CA, de Vasconcellos LM. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Nov;26(11):259.
43. Long J.A.; Evans H.M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer. Calif.*, v. 6, p. 1-148, 1922.
44. Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., Ralph Muller, R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010;25(7):1468–1486. DOI: 10.1002/jbmr.141.
45. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(1):2-17.
46. Hall, A.P., Escott, K.J., Sanganee, H., Hickling, K.C., 2015. Preclinical toxicity of AZD7969: effects of GSK3beta inhibition in adult stem cells. *Toxicol. Pathol.* 43, 384e399.
47. Bradbury, J.M., Edwards, P.A., Niemeyer, C.C., Dale, T.C., 1995. Wnt-4 expression induces a pregnancy-like growth pattern in reconstituted mammary glands in virgin mice. *Dev. Biol.* 170, 553e563.
48. Watanabe, A., Yoneyama, S., Nakajima, M., Sato, N., Takao-Kawabata, R., Isogai, Y., Sakurai-Tanikawa, A., Higuchi, K., Shimoi, A., Yamatoya, H., Yoshida, K., Kohira, T., 2012. Osteosarcoma in Sprague-Dawley rats after long-term treatment with teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)). *J. Toxicol. Sci.* 37, 617e629.