

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2023.

FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio

**Araçatuba – SP
2021**

FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA

Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba — UNESP, para a obtenção do Título de "Doutor em Odontologia" (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof^a. Associada Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Adj. Paulo Noronha Lisboa Filho

**Araçatuba – SP
2021**

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

B333c Batista, Fábio Roberto de Souza.
Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas à deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio / Fábio Roberto de Souza Batista. - Araçatuba, 2021
67 f. : il.; tab.

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

1. Osteoporose 2. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos 3. Interface osso-implante 4. Osseointegração 5. Óxido nítrico I. T.

Black D7
CDD 617.6

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Eu dedico esta conquista as pessoas mais importantes da minha vida, os quais foram a base de tudo que me formei, aqueles que fundamentam a minha história: **a minha família.**

À minha família, Maria Aparecida de Souza Batista, Guido José Batista e Victor Eduardo de Souza Batista, pelo apoio, sem medir esforços para a concretização deste sonho. Sem minha família esta conquista seria impossível. Agradeço todo o dia por tê-los ao meu lado. Vocês são meus exemplos de amor incondicional.

À minha mãe, Maria Aparecida de Souza Batista, pelo exemplo de mulher, pelo amor incondicional, pelo abraço carinhoso nos momentos de angústia, além de todos os conselhos nos momentos de incerteza que vivenciei. Te amo mãe!

Ao meu pai, Guido José Batista, por todo o incentivo na profissão, pela oportunidade concedida para poder crescer, além dos valores éticos e morais para minha formação. Te amo pai!

Ao meu irmão, Victor Eduardo de Souza Batista, pelo exemplo de dedicação e esforço, por ser meu mentor durante essa trajetória na pós-graduação, além de todos os conselhos nos momentos de incerteza que vivenciei. Te amo irmão!

À minha namorada, Jaqueline Silva dos Santos. Meu amor, quero te agradecer por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Nós dois caminhamos juntos em parceria, e é muito bom poder contar com alguém, é melhor ainda quando esse alguém é você. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por me dar esta vida plena de verdade e alegria.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte de toda a trajetória desde o meu ingresso ao curso de Pós Graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

À minha Orientadora

Minha orientadora, **Professora Adjunta Roberta Okamoto**, eu agradeço por todas as oportunidades e apoio ao longo do meu mestrado e doutorado. Minha admiração e respeito crescem a cada dia que passa, devido à sua capacidade admirável de liderar nosso grupo. Uma líder que corrige sem ofender e orienta sem humilhar, de fato, um exemplo que levarei para minha vida acadêmica. Seu apoio e conselhos têm permitido meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

Ao meu Coorientador

Ao meu coorientador, **Professor Adjunto Paulo Noronha Lisboa Filho**, eu agradeço por todas as lições. Expresso minha sincera admiração e respeito ao senhor.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Prof. Dr. Francisley Ávila Campos, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Daniela Ponzoni.**

Aos docentes, funcionários, estagiários e pós-graduandos do Departamento de Ciências Básicas, Diagnóstico e Cirurgia.

Aos professores da disciplina de Anatomia, **Prof. Titular José Américo de Oliveira, Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo e Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin.**

Aos professores da disciplina de Histologia **Prof. Edilson Ervolino** e **Prof. Mariza Akemi Matsumoto**, pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos.

Aos funcionários e colegas da disciplina de Anatomia: Senhores **José Ari Gualberto Junqueira** e **Arnaldo César dos Santos**, por todo o suporte.

À empresa Emfils Itu-SP pela fabricação e fornecimento dos implantes.

À senhora Márcia Sirlene Zardin Graeff (CIP, FOB-USP) pela atenção e disponibilidade.

À senhora Dirce Colli Boatto (FOA-UNESP) por toda ajuda durante o processamento laboratorial.

Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado (**processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011**).

Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e Ciências Básicas. Meu muito Obrigado.

As Alunas de iniciação Científica da nossa equipe, pela disponibilidade, amizade, auxílio, boa vontade e por tornar toda a parte da execução do trabalho mais fácil e agradável, meu muito obrigado.

Aos alunos da graduação e pós-graduação, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado, auxiliando no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

CAPES

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

CNPq

Processo nº 140050/2019-1, Centro Nacional de Qualificação Profissional (CNPq).

FAPESP

Processo nº 2018/03114-0, Auxílio a Pesquisa Regular

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor pela oportunidade de realização do curso de Doutorado. A cada dia admiro mais esta universidade e agradeço ainda as oportunidades que esta casa me forneceu e continua fornecendo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” na pessoa do Prof. Adj. André Luís Fraga Briso.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do doutorado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

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

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia. Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp. Profa.Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Prof.Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho.

Aos Professores da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Prof. Dr. Liogi Iwaki Filho e Prof. Dr. Ângelo José Pavan.

***“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram
aqueles em que lutastes”***

Sigmund Freud

Batista FRS. Caracterização do tecido ósseo peri-implantar frente ao uso do óxido nítrico para funcionalização da superfície de implantes instalados na maxila de ratas induzidas a deficiência de estrógeno e síndrome metabólica tratadas com risedronato de sódio [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2021.

RESUMO

Objetivo: caracterizar o processo de reparo ósseo peri-implantar em maxilas de ratas ovariectomizadas com síndrome metabólica induzida por dieta de cafeteria, tratadas com risedronato e instalação de implantes funcionalizados com $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY). **Materiais e métodos:** os testes *in vitro* realizados na Fase 1 avaliou as propriedades biológicas e físico-químicas da melhor concentração da TERPY frente às respostas osteogênicas, para a funcionalização dos implantes pela técnica de LbL. A realização de experimentos *in vivo* na Fase 2 avaliou o efeito da superfície funcionalizada durante o reparo ósseo peri-implantar. Para isso, 48 ratas *Wistar* foram divididas em: SHAM CONV (n=8), OVX SM CONV (n=8), OVX SM RIS CONV (n=8), SHAM TERPY (n=8), OVX SM TERPY (n=8) e OVX SM RIS TERPY (n=8). Em t=0, as ratas foram submetidas à cirurgia fictícia (SHAM) e à cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX); após a recuperação da cirurgia, os animais receberam a dieta de cafeteria (SM). Passados 30 dias (t=30), o tratamento medicamentoso com risedronato de sódio (0,7 mg/kg/semana) (RIS) ou solução salina (0,3 ml), via gavagem, foi iniciado e realizado até o momento da eutanásia. Sessenta dias após o início do tratamento medicamentoso (t=90), a cirurgia de exodontia do primeiro molar superior foi realizada junto à instalação imediata dos implantes de forma bilateral (CONV ou TERPY). Quatorze dias após a cirurgia de instalação dos implantes (t=104), todos os grupos experimentais receberam a injeção intramuscular do fluorocromo calceína (20 mg/kg) e após 10 dias (t=114), do fluorocromo vermelho de alizarina (25 mg/kg). Aos 28 dias pós-operatórios (dia da eutanásia, t=118), os animais foram anestesiados e, nas maxilas do lado direito, os implantes foram submetidos ao torque reverso e imediatamente após a remoção dos implantes, foi realizada a coleta do tecido ósseo para análise de PCR tempo real para avaliação da expressão relativa de ALP, iBSP, OCN, OPG, RANKL, TRAP e VEGF, seguido da eutanásia dos animais; as maxilas do lado esquerdo foram coletadas para a análise de Micro-CT (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e i.S) e, após o escaneamento, as mesmas passaram pelo processamento para análise da dinâmica óssea por fluorocromos (MAR e ELCOI). Os dados foram submetidos à análise estatística, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Fase 1: poucas diferenças foram observadas entre as duas concentrações avaliadas e assim, a menor

concentração do fármaco foi selecionada (10 μ M). Fase 2: os implantes funcionalizados com a TERPY apresentaram os maiores valores absolutos de torque de remoção para todos os grupos e com diferença estatística para OVX SM TERPY (p=0,0402). A associação sistêmica entre o risedronato e a TERPY em ratas ovariectomizadas (OVX SM RIS TERPY) demonstrou expressão aumentada para iBSP e equilíbrio entre OPG e RANKL, corroborando com os dados obtidos para MAR (p=0,0052) e com os parâmetros de BV/TV, Tb.Th e i.S da análise microtomográfica para esse mesmo grupo. Conclusão: o desempenho clínico dos implantes funcionalizados com TERPY foi favorável, e, quando associado à administração sistêmica de risedronato de sódio, os resultados se tornam mais promissores.

Palavras-chave: Osteoporose. Osteonecrose por bifosfonatos. Interface osso-implante. Osseointegração. Óxido nítrico.

Batista FRS. Characterization of peri-implant bone tissue against the use of nitric oxide for surface functionalization of implants installed in the maxilla of rats induced to estrogen deficiency and metabolic syndrome treated with risedronate sodium [tese]. Araçatuba: College of Dentistry - State University Paulista; 2021.

ABSTRACT

Objective: characterize the peri-implant bone tissue repair process in maxilla of ovariectomized rats with metabolic syndrome induced by cafeteria diet, treated with risedronate and through placement the implants functionalized with [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY). Materials and methods: *in vitro* tests performed in Phase 1 evaluated the biological and physicochemical properties of the better concentration of TERPY against osteogenic responses, for the functionalization of implants using the LbL technique. *In vivo* experiments in Phase 2 evaluated the effect of functionalized surface during peri-implant bone repair. For this, 48 female rats were divided: SHAM CONV (n=8), OVX SM CONV (n=8), OVX SM RIS CONV (n=8), SHAM TERPY (n=8), OVX SM TERPY (n=8) and OVX SM RIS TERPY (n=8). At t=0, the rats underwent unreal surgery (SHAM) and bilateral ovariectomy surgery (OVX); after recovery from surgery, animals received cafeteria diet (SM). After 30 days (t=30), drug treatment with risedronate sodium (0.7 mg/kg/week) (RIS) or saline solution (0.3 ml), via gavage, was started and sustained out until the time of euthanasia. Sixty days after the start of drug treatment (t=90), the maxillary first molar extraction surgery was performed followed by the immediate installation of the implants bilaterally (CONV or TERPY). Fourteen days after implant placement surgery (t=104), all experimental groups received intramuscular injection of the fluorochrome calcein (20 mg/kg) and after 10 days (t=114), the red fluorochrome alizarin (25 mg/kg). After 28 postoperative days (day of euthanasia, t=118), the animals were anesthetized and, in the maxillary on the right side, the implants were subjected to reverse torque and immediately after removal of the implants, bone tissue was collected for real-time PCR analysis to measure the relative expression of ALP, iBSP, OCN, OPG, RANKL, TRAP e VEGF, followed by euthanasia of animals; the left side maxillary were collected for Micro-CT analysis (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e i.S) and, after scanning, they underwent processing for analysis of bone dynamics by fluorochromes (MAR and ELCOI). Data values were subjected to statistical analysis, with a significance level of 5% (p<0.05). Results: Phase 1: few differences were observed between the two concentrations evaluated and thus, the lowest drug concentration was selected (10µM). Phase 2: the implants functionalized with TERPY presented the highest absolute values of removal torque for all

groups and with statistical difference for OVX SM TERPY ($p=0.0402$). The systemic association between risedronate and TERPY in ovariectomized rats (OVX SM RIS TERPY) showed increased expression for iBSP and balance between OPG and RANKL, corroborating the data obtained for MAR ($p=0.0052$) and with the parameters BV/TV, Tb.Th and i.S of the microtomographic analysis for this same group. Conclusion: the clinical performance of implants functionalized with TERPY was favorable, and when associated with the systemic administration of risedronate sodium, the results become more promising.

Keywords: Osteoporosis. Bisphosphonate osteonecrosis. Bone-implant interface. Osseointegration. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Delineamento experimental - Experimentos <i>in vivo</i>	24
Figura 2.	Cirurgia de Exodontia	35
Figura 3.	Cirurgia para instalação dos implantes imediatos	36
Figura 4.	MEV-EDS	48
Figura 5.	Curva de calibração para TPY (-)	49
Figura 6.	Peso corporal em T1, T2 e T3	50
Figura 7.	Glicemia em T1, T2 e T3	51
Figura 8.	Índice de Lee em T1, T2 e T3	52
Figura 9.	Parâmetros da análise de Micro-CT	59
Figura 10.	Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser para todos os grupos e suas respectivas superfícies	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantidade de alimento dada para os animais por dia	33
Tabela 2.	Quantificação de TERPY adsorvida na superfície do implante	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Absorbância por MTT	44
Gráfico 2.	Viabilidade celular	45
Gráfico 3.	Nódulos de mineralização	46
Gráfico 4.	Genotoxicidade celular	47
Gráfico 5.	Biomecânica	53
Gráfico 6.	PCR em tempo real para ALP	54
Gráfico 7.	PCR em tempo real para iBSP	55
Gráfico 8.	PCR em tempo real para OCN	55
Gráfico 9.	PCR em tempo real para OPG	56
Gráfico 10.	PCR em tempo real para RANKL	57
Gráfico 11.	PCR em tempo real para TRAP	57
Gráfico 12.	PCR em tempo real para VEGF	58
Gráfico 13.	MAR	61
Gráfico 14.	ELCOI	62

LISTA DE ABREVIações

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
NO	Óxido nítrico
[Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	Complexo de rutênio doador de óxido nítrico
OVX	Ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia
TPY (-)	Terpy 10μM
TPY (+)	Terpy 100μM
LSMT	Laboratory of Study for Mineralized Tissue
PSS	Poliestireno sulfonado
TiO ₂	Óxido de titânio
α-MEM	Alfa com L-glutamina
SBR	Soro fetal bovino
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol
LbL	Layer-by-Layer
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
MET HRMET	Microscopia eletrônica de alta transmissão de alta resolução
UV-Vis	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível
KCl	Cloreto de potássio
CONV	Superfície de implante convencional
SHAM CONV	Ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
OVX SM CONV	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
OVX SM RIS CONV	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície convencional (CONV)
SHAM TERPY	Ratas controle, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)

OVX SM TERPY	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, sem tratamento medicamentoso e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)
OVX SM RIS TERPY	Ratas ovariectomizadas, com síndrome metabólica, com tratamento com risedronato e instalação de implantes de superfície funcionalizada (TERPY)
Ca ²⁺	Cálcio
P	Fósforo
PCR	Proteína C-reativa
ALP	Fosfatase alcalina
iBSP	Sialoproteína óssea
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ΔΔCT	Método CT comparativo
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
BV/TV	Volume ósseo
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
i.S	Superfície de intersecção
TIFF	Tagged Image File Format
MAR	Mineral Apposition Rate
ELCOI	Extensão linear de contato osso-implante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Experimentos preliminares	23
2.2 Caracterização biológica e físico-química dos discos de titânio	23
2.2.1 Preparo dos discos e concentrações	23
2.3 Experimentos <i>in vitro</i> para validação de concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	24
2.3.1 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	24
2.3.2 Determinação da viabilidade celular	25
2.3.3 Análise de formação de nódulos de mineralização	25
2.3.4 Genotoxicidade	25
2.4 Funcionalização dos implantes após a validação da TERPY	26
2.4.1 Funcionalização das superfícies dos implantes	26
2.4.2 Caracterização das superfícies por MEV-EDS	27
2.5 Procedimentos experimentais para quantificação da TERPY	27
2.5.1 Análise da quantificação de TERPY por espectroscopia na região do UV-Vis	27
2.6 Experimentos <i>in vivo</i>	29
2.7 Animais	29
2.8 Delineamento experimental	30
2.8.1 Castração bilateral - Ovariectomia	31
2.8.2 Ciclo estral	32
2.8.3 Tratamento medicamentoso	32
2.8.4 Dieta de cafeteria para indução da Síndrome Metabólica	33
2.8.5 Cirurgia de exodontia	34
2.8.6 Cirurgia para instalação dos implantes imediatos	35
2.8.7 Aplicação dos fluorocromos	37
2.8.8 Eutanásia	37
2.9 Análises – Maxila dividida – Lado direito	38
2.9.1 Análise Biomecânica – Torque reverso	38
2.9.2 Análise de PCR em tempo real	38
2.10 Análises – Maxila dividida – Lado esquerdo	40
2.10.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	40
2.10.2 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)	41
2.11 Análise estatística	43
3. RESULTADOS	44
3.1 Validação da concentração do agente [Ru (terpy) (bdq) NO] ³⁺ (TERPY)	44
3.1.1 Viabilidade celular	44

3.1.2 Nódulos de Mineralização	45
3.1.3 Teste de micronúcleos	46
3.2 Seleção da melhor concentração de TERPY	47
3.3 Dados físico-químicos após seleção da TPY (-)	47
3.3.1 Caracterização das superfícies	47
3.3.2 Espectroscopia na região do UV-Vis	48
3.4 Experimentos <i>in vivo</i>	50
3.4.1 Síndrome metabólica	50
3.4.2 Peso	50
3.4.3 Glicemia	51
3.4.4 Índice de Lee	51
3.5 Análise Biomecânica – Torque reverso	53
3.6 Análise de PCR em tempo real	54
3.6.1 Fosfatase Alcalina (ALP)	54
3.6.2 Sialoproteína óssea (iBSP)	54
3.6.3 Osteocalcina (OCN)	55
3.6.4 Osteoprotegerina (OPG)	56
3.6.5 Ativador do Receptor Nuclear Kappa B Ligante (RANKL)	56
3.6.6 Fosfatase Ácida Resistente ao Ácido Tartárico (TRAP)	57
3.6.7 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	58
3.7 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	59
3.8 Microscopia Confocal a Laser (histometria dinâmica peri-implantar)	60
3.8.1 Taxa de Aposição Mineral Diária (MAR)	61
3.8.2 Extensão linear de contato osso-implante (ELCOI)	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	
ANEXO A	79
ANEXO B	80
ANEXO C	81

1 INTRODUÇÃO

O aumento do risco de alterações patológicas provocadas pela senilidade é intensificado pela perda da homeostasia do organismo em função das complexas transformações nos eixos hormonais reguladores do metabolismo, como a diminuição da secreção hormonal e perda de sensibilidade dos tecidos a estes [1-3].

O estrogênio desempenha influência sobre o *turnover* ósseo a partir da regulação direta sobre a proliferação de osteoblastos e inibição de osteoclastos [4,5]. No período pós-menopausa, o declínio dos níveis desse hormônio leva à deformação dessa dinâmica a partir do aumento da atividade osteoclástica, excedendo os níveis normais de reabsorção e como consequência, a acelerada perda de massa óssea e aumento do risco de fraturas [4-9]. Ainda, a deficiência de estrógenos pode levar à disfunção das células β -pancreáticas, resistência à insulina, excesso de gordura no fígado, aterosclerose, aumento do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), intensificando assim alterações patológicas já oriundas da senilidade, como as doenças cardiovasculares, o risco de obesidade, ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica [1,10,11].

A síndrome metabólica engloba diferentes tipos de anormalidades associadas como a hipertensão, altos níveis de triacilgliceróis, baixos níveis de HDL, resistência à insulina, disfunções no metabolismo da glicose e estado pró-inflamatório [10,12], sendo a obesidade considerada uma das principais razões para o seu desenvolvimento [13,14]. Essa combinação de fatores compõe uma série de efeitos independentes sobre o metabolismo ósseo e que pode estar relacionada ao desenvolvimento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, uma vez que a privação de estrogênio também aumenta a probabilidade de desenvolvimento dessa disfunção a partir do aumento da gordura visceral, ganho de peso e resistência à insulina [15].

O padrão ouro para o tratamento da osteoporose é realizado a partir da administração de bifosfonatos, sendo o alendronato e o risedronato de sódio os antirreabsortivos orais de primeira escolha [16] em razão da meia vida longa e capacidade de permanência em seus respectivos sítios de ligação pelo período de meses a anos [17]. O risedronato é um composto piridilo da terceira geração [18] que contém nitrogênio em sua estrutura química, enquadrando-se como um bifosfonato nitrogenado, apresentando maior potência clínica e melhor afinidade de ligação ao tecido ósseo [19], ainda que a literatura sustente redução da formação de vasos sanguíneos em resposta ao ácido zoledrônico, demonstrando que além da atividade antirreabsortiva, os bifosfonatos nitrogenados possuem propriedades antiangiogênicas [20]. Dado que a osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos é

a complicação frequentemente associada ao uso dos bifosfonatos, classicamente considerada como uma necrose avascular por uma interrupção no fornecimento sanguíneo, a inibição da angiogênese é uma hipótese principal na fisiopatologia dessa complicação [21], além da supressão da remodelação óssea por inibição de osteoclastos acompanhada de esclerose óssea, isquemia, microtrauma constante e efeitos citotóxicos celulares [19,21].

Muitos mediadores químicos estão envolvidos no processo de reparo e cura de feridas a partir da inflamação, formação de tecido e remodelação. O mesmo transcorre durante o processo do reparo ósseo peri-implantar a partir do *turnover* ósseo, que também requer o envolvimento de mediadores solúveis, matriz extracelular e de células sanguíneas e parenquimatosas [22]. O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização produzida em resposta a diferentes estímulos, que atua como um mediador primário no aumento da massa óssea através da estimulação mecânica, inibindo a osteoclasia [23] e ainda, estudos *in vitro* apontam que o NO parece desempenhar um papel regulador autócrino e parácrino no metabolismo ósseo, a partir da modulação da atividade de osteoblastos, aumentando a proliferação osteoblástica e a síntese de osteocalcina, favorecendo a formação inicial da matriz mineral óssea [24,25].

O agente [Ru (terpy) (bdq) NO]³⁺ (TERPY) é um complexo de rutênio doador de óxido nítrico que aumenta a produção desse mediador pelas células endoteliais [26,27]. Estudos afirmam que o aporte sanguíneo é um fator crítico para a cura de fraturas e, considerando o papel do NO na angiogênese e na vasodilatação, esses dados fundamentam a influência desse mediador durante a cicatrização óssea através da inibição da apoptose de células endoteliais e por ação direta na produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [22]. Ademais, dados pré-clínicos contribuem quanto ao papel do NO na biologia óssea e sugerem que substâncias doadoras de NO podem prevenir a perda óssea em mulheres pós-menopáusicas [28], além dos estudos pilotos em humanos que apoiam o conceito do uso desses doadores para prevenir a perda óssea, assim como a administração de NO exógeno [24].

Em vista da grande demanda pela classe idosa em busca de tratamentos reabilitadores e estéticos a partir de implantes dentários, e de que essa mesma população compõe um cenário de saúde geral clinicamente comprometido [29-31], considerando o tratamento da osteoporose com o uso de bifosfonatos, associado ao estilo de vida a partir dos hábitos alimentares e suas interferências na condição sistêmica do indivíduo, estudos pré-clínicos que possam mimetizar essa situação devem caracterizar tanto os benefícios quanto os prejuízos

durante o reparo ósseo peri-implantar nesse modelo, uma vez que faz-se necessário o estudo da longevidade desses implantes para posteriores aplicações de cargas protéticas [21, 32].

O modelo animal OVX (rata submetida à ovariectomia) já é consolidado na literatura como um indutor da osteopenia e osteoporose por meio da deficiência de estrógeno que se estabelece após a remoção dos ovários [33]. Em adição, a instalação de implantes em maxila de ratos *Wistar* demonstra ser um modelo experimental interessante para o estudo da osseointegração em ratas ovariectomizadas, proporcionando resultados e aspectos mais próximos dos eventos que ocorrem durante o processo de reparo em humanos [34-36].

Modelos de dietas hipercalóricas manipuladas visam mimetizar os padrões de má nutrição humana para caracterização das consequências e propostas reversivas decorrentes dessa situação. A dieta de cafeteria é um modelo experimental proposto para estudar a obesidade e síndrome metabólica que consiste em associar a ração comercial do animal às comidas humanas altamente palatáveis, calóricas e não saudáveis, simulando parte dos hábitos alimentares das pessoas dos países ocidentais [37,38]. Em ratos, a dieta de cafeteria promove o aumento de peso, hiperfagia, quadro pré-diabético, resistência periférica à insulina, aumento dos níveis de leptina, colesterol total e triacilgliceróis séricos, além de inflamação dos tecidos adiposo e hepático [1,37,39-42].

Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi de avaliar e caracterizar o processo de reparo ósseo peri-implantar em maxilas de ratas ovariectomizadas que apresentavam síndrome metabólica induzida por dieta de cafeteria, tratadas com risedronato de sódio e instalação de implantes funcionalizados com um agente doador de óxido nítrico (TERPY) em sua superfície.

5 CONCLUSÃO

Com base nas análises *in vivo*, pode-se concluir que a TERPY é uma biomolécula que estimula a precipitação mineral de forma positiva sobre o reparo peri-implantar quando comparada à superfície convencional e, frente à deficiência de estrógeno, age sinergicamente ao risedronato de sódio, inibindo seus efeitos sobre o metabolismo ósseo e favorecendo a osseointegração de implantes instalados em animais comprometidos sistemicamente.

REFERÊNCIAS

- 1- de Quadros VP, Tobar N, Viana LR, Dos Santos RW, Kiyataka PHM, Gomes-Marcondes MCC. The 17 β -oestradiol treatment minimizes the adverse effects of protein restriction on bone parameters in ovariectomized Wistar rats: Relevance to osteoporosis and the menopause. *Bone Joint Res.* 2020 Jan 8;8(12):573-581. doi: 10.1302/2046-3758.812.BJR-2018-0259.R2.
- 2- Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.* 2012 Jun;61(6):1315-22. doi: 10.2337/db11-1300.
- 3- Jones CM, Boelaert K. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;61(4):291-300. doi: 10.1159/000367692.
- 4- Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1186-94. doi: 10.1172/JCI28550.
- 5- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Nov;23(11):576-81. doi: 10.1016/j.tem.2012.03.008.
- 6- Anil S, Preethanath RS, AlMoharib HS, Kamath KP, Anand PS. Impact of osteoporosis and its treatment on oral health. *Am J Med Sci.* 2013 Nov;346(5):396-401. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31828983da.
- 7- Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids.* 2015 Jul;99(Pt A):11-5. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.010.
- 8- Warren MP, Shu AR, Dominguez JE. Menopause and hormone replacement. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth: MDText.com; 2015 [citado 2021 jun 6]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279050/>.
- 9- Qi S, Zheng H. Combined Effects of Phytoestrogen Genistein and Silicon on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rat. *Biol Trace Elem Res.* 2017 Jun;177(2):281-287. doi: 10.1007/s12011-016-0882-1.
- 10- Rodriguez-Cano A, Mier-Cabrera J, Balas-Nakash M, Muñoz-Manrique C, Legorreta-Legorreta J, Perichart-Perera O. Dietary changes associated with improvement of metabolic syndrome components in postmenopausal women receiving two different nutrition interventions. *Menopause.* 2015 Jul;22(7):758-64. doi: 10.1097/GME.0000000000000400.

- 11- Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev.* 2013 Jun;34(3):309-38. doi: 10.1210/er.2012-1055.
- 12- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol.* 2012 Jan;212(1):3-12. doi: 10.1530/JOE-11-0044.
- 13- Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.* 2011 Jun 15;6:30. doi: 10.1186/1749-799X-6-30.
- 14- Liu PY, Ilich JZ, Brummel-Smith K, Ghosh S. New insight into fat, muscle and bone relationship in women: determining the threshold at which body fat assumes negative relationship with bone mineral density. *Int J Prev Med.* 2014 Nov;5(11):1452-63.
- 15- Park YM, Padilla J, Kanaley JA, Zidon TM, Welly RJ, Britton SL, Koch LG, Thyfault JP, Booth FW, Vieira-Potter VJ. Voluntary Running Attenuates Metabolic Dysfunction in Ovariectomized Low-Fit Rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2017 Feb;49(2):254-264. doi: 10.1249/MSS.0000000000001101.
- 16- 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.
- 17- Ferreira Junior CD, Casado PL, Barboza LSP. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na odontologia. *Rev Periodontia.* 2007;17(4):24-30.
- 18- Shigematsu T, Muraoka R, Sugimoto T, Nishizawa Y. Risedronate therapy in patients with mild-to-moderate chronic kidney disease with osteoporosis: post-hoc analysis of data from the risedronate phase III clinical trials. *BMC Nephrol.* 2017 Feb 15;18(1):66. doi: 10.1186/s12882-017-0478-9.
- 19- Holtmann H, Lommen J, Kübler NR, et al. Pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw: a comparative study of in vivo and in vitro trials. *J Int Med Res.* 2018;46(10):4277-4296. doi:10.1177/0300060518788987.
- 20- Stresing V, Fournier PG, Bellahcène A, Benzaïd I, Mönkkönen H, Colombel M, Ebetino FH, Castronovo V, Clézardin P. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone.* 2011 Feb;48(2):259-66. doi: 10.1016/j.bone.2010.09.035.
- 21- 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.
- 22- Farhad AR, Razavi SM, Rozati AR, Shekarchizade N, Manshaei M. Selective nitric oxide synthase inhibitor promotes bone healing. *Dent Res J (Isfahan).* 2017 Sep-Oct;14(5):306-313. doi: 10.4103/1735-3327.215965.
- 23- Song GG, Lee YH. Association of eNOS polymorphisms with susceptibility to osteonecrosis of the femur head: A meta-analysis. *Z Rheumatol.* 2017 Apr;76(3):267-273. English. doi: 10.1007/s00393-016-0093-3. PMID: 27312465.
- 24- Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar; 1192:391-403. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05230. x.
- 25- Wimalawansa SJ. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov; 1117:283-97. doi: 10.1196/annals.1402.066.
- 26- Lunardi CN, da Silva RS, Bendhack LM. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Jan;42(1):87-93. doi: 10.1590/s0100-879x2009000100013.
- 27- Potje SR, Chen Z, Oliveira SDS, Bendhack LM, da Silva RS, Bonini MG, Antoniali C, Minshall RD. Nitric oxide donor $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$ induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production. *Free Radic Biol Med.* 2017 Nov; 112:587-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.004.
- 28- Joshua J, Kalyanaraman H, Marathe N, Pilz RB. Nitric oxide as a mediator of estrogen effects in osteocytes. *Vitam Horm.* 2014; 96:247-63. doi: 10.1016/B978-0-12-800254-4.00010-6.
- 29- Müller F. Interventions for edentate elders--what is the evidence? *Gerodontology.* 2014 Feb;31 Suppl 1:44-51. doi: 10.1111/ger.12083.
- 30- Alghamdi HS, Van Den Beucken JJP, Jansen JA. Osteoporosis–fracture healing and osseointegration. *Drug Discov Today Dis Models.* 2014;13:3-9. doi: 10.1016/j.ddmod.2014.10.001.
- 31- Dudley J. Implants for the ageing population. *Aust Dent J.* 2015 Mar;60 Suppl 1:28-43. doi: 10.1111/adj.12282.
- 32- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Jamil NA, Ima-Nirwana S. Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet in a rat model. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:191-200. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.042.

- 33- Fu SW, Zeng GF, Zong SH, Zhang ZY, Zou B, Fang Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutr Res.* 2014;34(6):467-77. doi: 10.1016/j.nutres.2014.05.003.
- 34- Faverani LP, Polo TO, Ramalho-Ferreira G, Momesso GA, Hassumi JS, Rossi AC, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2017;22:255-65. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2.
- 35- Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(1):42-52.
- 36- Hiyari S, Wong RL, Yaghsezian A, Naghibi A, Tetradis S, Camargo PM, et al. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2018;45(1):89-99. doi: 10.1111/jcpe.12817.
- 37- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011;19(6):1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.
- 38- Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(5):655-67. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.004.
- 39- Andrade GF, Almeida CD, Espeschit AC, Dantas MI, Benjamin LA, Ribeiro SM, et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2013;12:145. doi: 10.1186/1476-511X-12-145.
- 40- Lalanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One.* 2014;9(1):e85049. doi: 10.1371/journal.pone.0085049.
- 41- Goularte JF, Ferreira MB, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr.* 2012;108(8):1511-8. doi: 10.1017/S0007114511006933.
- 42- Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E215-24. doi: 10.1152/ajpendo.00098.2010.

- 43- 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. doi: 10.1002/jat.1271.
- 44- 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.
- 45- de Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Nov 1;56:538-44. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.026.
- 46- de Camargo Reis Mello D, Rodrigues LM, D'Antola Mello FZ, Gonçalves TF, Ferreira B, Schneider SG, de Oliveira LD, de Vasconcellos LMR. Biological and microbiological interactions of Ti-35Nb-7Zr alloy and its basic elements on bone marrow stromal cells: good prospects for bone tissue engineering. *Int J Implant Dent*. 2020 Oct 25;6(1):65. doi: 10.1186/s40729-020-00261-3.
- 47- Shi Q, Qian Z, Liu D, Liu H. Modificação da superfície do implante de titânio dentário por auto-montagem eletrostática camada a camada. *Front Physiol*. 7 de agosto de 2017; 8: 574. doi: 10.3389 / fphys.2017.00574.
- 48- 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.jmbbm.2018.02.024.
- 49- Hernandez-Montelongo J, Corrales Ureña YR, Machado D, Lancelloti 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.
- 50- Trino LD, Dias LFG, Albano LGS, Bronze-Uhle 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.
- 51- Gomes-Ferreira PHS, Lisboa-Filho PN, da Silva AC, Bim-Júnior O, de Souza Batista FR, Ervolino-Silva AC, Garcia-Junior IR, Okamoto R. Sonochemical time standardization for bioactive materials used in periimplantar defects filling. *Ultrason Sonochem*. 2019 Sep;56:437-446. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.032.

- 52-long J.A.; evans H.M. The estorus cycle in the rat and its related phenomena. Mem. Univer.Calif., v. 6, p. 1-148, 1922.
- 53-I toh A, Akagi Y, Shimomura H, Aoyama T. Interaction between Bisphosphonates and Mineral Water: Study of Oral Risedronate Absorption in Rats. Biol Pharm Bull. 2016;39(3):323-8. doi: 10.1248/bpb.b15-00630.
- 54- Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. Free Radic Biol Med. 2013 Dec;65:254-261. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022.
- 55- Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. Physiol Behav. 2016 Dec 1;167:382-391. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029.
- 56- Du Z, Lee RS, Hamlet S, Doan N, Ivanovski S, Xiao Y. Evaluation of the first maxillary molar post-extraction socket as a model for dental implant osseointegration research. Clin Oral Implants Res. 2016;27(12):1469-1478. doi: 10.1111/clr.12571.
- 57- Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, Freire A, Faverani LP, Sumida DH, Okamoto R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. J Appl Oral Sci. 2018; 10;26:e20170470. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0470.
- 58- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 2013; 28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
- 59- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. Clin Oral Investig. 2017;21(5):1485-94. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.
- 60- lowry OH, rosebrough NJ, farr AL, randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.
- 61- 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. doi: 10.1007/s10856-015-5594-0.
- 62- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- 63- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- 64- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012 Sep;Chapter 5:Unit5.61. doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58.
- 65- Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X. In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *PeerJ*. 2017 Sep 13;5:e3697. doi: 10.7717/peerj.3697.
- 66- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*. 2016;8(6):347. Published 2016 Jun 7. doi:10.3390/nu8060347.
- 67- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*. 2016 Jun 7;8(6):347. doi: 10.3390/nu8060347.
- 68- Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):286-8. doi: 10.1161/01.cir.0000019884.36724.d9.
- 69- Sagae SC, Gobo CG, Paz ED, Menegotto JB, Yamashita PK, Franci CR, Balbo SL. Bloqueio do receptor AT1 da Angiotensina II reduz o número de folículos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria [Blockade of AT1 receptor of Angiotensin II reduces the number of antral follicles in female rats with obesity induced by cafeteria diet]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015 Jul;37(7):302-7. Portuguese. doi: 10.1590/S0100-720320150005352.
- 70- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.

- 71- Gaspard U. Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas*. 2009 Apr 20;62(4):362-5. doi: 10.1016/j.maturitas.2008.11.026.
- 72- Xue P, Gao P, Li Y. The association between metabolic syndrome and bone mineral density: a meta-analysis. *Endocrine*. 2012 Dec;42(3):546-54. doi: 10.1007/s12020-012-9684-1.
- 73- Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):255-265. doi: 10.1007/s00784-017-2106-2.
- 74- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1485-1494. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.
- 75- Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jun;44(6):798-805. doi: 10.1016/j.ijom.2015.02.018.
- 76- 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.
- 77- Roux C. Ostéoporose postménopausique: les traitements actuels [Postmenopausal osteoporosis: current treatment]. *Rev Med Interne*. 2004 Dec;25 Suppl 5:S568-72. French. doi: 10.1016/s0248-8663(04)80056-0.
- 78- Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clézardin P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6538-44. PMID: 12438248.
- 79- Hoefert S, Sade Hoefert C, Munz A, Schmitz I, Grimm M, Yuan A, Northoff H, Reinert S, Alexander D. Effect of bisphosphonates on macrophagic THP-1 cell survival in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Mar;121(3):222-32.

- 80- Brooks JK, Gilson AJ, Sindler AJ, Ashman SG, Schwartz KG, Nikitakis NG. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jun;103(6):780-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.10.010.
- 81- Sacco R, Woolley J, Yates J, Calasans-Maia MD, Akintola O, Patel V. The role of antiresorptive drugs and medication-related osteonecrosis of the jaw in nononcologic immunosuppressed patients: A systematic review. *J Res Med Sci*. 2021 Mar 31;26:23. doi: 10.4103/jrms.JRMS_794_20.
- 82- de Souza Batista FR; Ervolino-Silva AC; Pitol-Palin L; Hassumi JS; Monteiro NG; Okamoto R. Immediate implant installation in the maxilla of Wistar rats: description of the technique and definition of the analysis period by removal torque. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2021. **[No Prelo]**.
- 83- Heo HA, Park SH, Jeon YS, Pyo SW. Enhancing Effect of Intermittent Parathyroid Hormone Administration on Bone Formation After Titanium Implant Placement in an Ovariectomized Rat Maxilla. *Implant Dent*. 2016 Apr;25(2):227-31. doi: 10.1097/ID.0000000000000352.
- 84- de Lima RG, Sauaia MG, Bonaventura D, Tedesco AC, Bendhack LM, da Silva RS. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photo release by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg Chim Acta*. 2006;359:2543–2549 doi: 10.1016 / j.ica.2006.02.020.
- 85- Munhoz FC, Potje SR, Pereira AC, Daruge MG, da Silva RS, Bendhack LM, Antoniali C. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}(+)](3+)$ in spontaneously hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2012 Feb 15;26(2):111-7. doi: 10.1016/j.niox.2011.12.008.
- 86- Ye T, Cao P, Qi J, Zhou Q, Rao DS, Qiu S. Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186012. Published 2017 Oct 18. doi: 10.1371/journal.pone.0186012.
- 87- Potje SR, Chen Z, Oliveira SDS, et al. Nitric oxide donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production. *Free Radic Biol Med*. 2017;112:587-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.004.
- 88- Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, et al. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*. 2010;31(10):2728-2735. doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2009.12.029Anastasio AT, Paniagua A, Diamond C, Ferlauto HR, Fernandez-Moure JS. Nanomaterial Nitric Oxide Delivery in Traumatic Orthopedic Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:592008. Published 2021 Jan 18. doi:10.3389/fbioe.2020.592008.
- 89- Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials.* 2009 Jul;30(20):3390-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.047.
- 90- Anastasio AT, Paniagua A, Diamond C, Ferlauto HR, Fernandez-Moure JS. Nanomaterial Nitric Oxide Delivery in Traumatic Orthopedic Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:592008. Published 2021 Jan 18. doi:10.3389/fbioe.2020.592008
- 91- Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *ScientificWorldJournal.* 2010 Apr 13;10:624-32. doi: 10.1100/tsw.2010.58.
- 92- Rajendran S, Shen X, Glawe J, Kolluru GK, Kevil CG. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Growth and Remodeling. *Compr Physiol.* 2019;9(3):1213-1247. Published 2019 Jun 12. doi:10.1002/cphy.c180026.
- 93- Afzal F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J Pathol.* 2004 Apr;202(4):503-10. doi: 10.1002/path.1536.
- 94- Guazzo R, Sbricoli L, Ricci S, Bressan E, Piattelli A, Iaculli F. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw and Dental Implants Failures: A Systematic Review. *J Oral Implantol.* 2017 Feb;43(1):51-57. doi: 10.1563/aaid-joi-16-00057.