



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Luiz Guilherme Freitas de Paula

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE ÓLEO
INSAPONIFICÁVEL DE ABACATE E SOJA NA
OSSEOINTEGRAÇÃO. AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA,
RADIOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA EM RATOS**

Araraquara

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Luiz Guilherme Freitas de Paula

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE ÓLEO INSAPONIFICÁVEL DE
ABACATE E SOJA NA OSSEOINTEGRAÇÃO. AVALIAÇÃO
BIOMECÂNICA, RADIOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA EM RATOS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA-ÁREA DE PERIODONTIA
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM ODONTOLOGIA.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

ARARAQUARA

2012

Paula, Luiz Guilherme Freitas de

Utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração. Avaliação biomecânica, radiográfica, histológica e histomorfométrica em ratos / Luiz Guilherme Freitas de Paula. - Araraquara: [s.n.], 2012.

57 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Fitoterapia 2. Remodelação óssea 3. Implantes dentários
I. Título

LUIZ GUILHERME FREITAS DE PAULA

Utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração. Avaliação biomecânica, radiográfica, histológica e histomorfométrica em ratos

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Ana Emilia Farias Pontes

Araraquara, 28 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

Luiz Guilherme Freitas de Paula

NASCIMENTO 22 de Dezembro de 1984 - S. J. do Rio Preto / SP

FILIAÇÃO Luiz Carlos Freitas de Paula
Vera Lúcia Freitas de Paula

2004-2007 Graduação em Odontologia
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos

Especialização em Implantodontia

2008-2010 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado

2010-2012 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dedicatória

À **Deus**, que me abençoou e guiou todos os meus passos.

Aos meus pais, meus exemplos de vida e verdadeiros amigos, pela paciência, carinho, amor e por todas as vezes que abriram mão de suas vontades para realizarem os meus sonhos. Obrigado por me proporcionarem tantas oportunidades e por acreditarem em mim. Pai, mãe, amo vocês e sou eternamente grato por tudo!

À minha irmã, tios, tias, primos, avós; uma gratidão eterna pela força e otimismo sempre; pela paciência e compreensão da minha ausência em alguns momentos, que seja justificada com o resultado de todo meu esforço e dedicação.

À Fernanda Moisés, por estar ao meu lado, apoiando e incentivando sempre. Pelo amor e companheirismo dedicados a mim, mesmo nos momentos em que não pude estar presente. Obrigado por fazer parte da minha vida!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Elcio Marcantonio, por me acolher quando eu mais precisava, por abrir as portas do seu local de trabalho pra que eu aprendesse da melhor forma possível, as diversas técnicas cirúrgicas com todo seu talento e perfeição. O senhor é um exemplo de humildade e superação. Foi um prazer conviver por todo esse tempo, muito obrigado pela amizade e tenha certeza de que levarei esses conhecimentos para o resto da vida.

Ao 'irmão' Felipe Coletti, serei eternamente grato por ter me acolhido e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Conte comigo sempre. Você foi essencial pra eu vencer essa etapa!

À Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiéricsi Marcantonio, pelo imenso conhecimento transmitido, por toda paciência e, sobretudo, pela sua amizade. Em todo esse tempo que fiquei sob a sua orientação aprendi lições de vida e de moral que eu espero que façam parte do meu ser. Obrigado por tudo professora!

Ao Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, pelo incentivo aos meus primeiros passos na vida acadêmica, pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos e confiança depositada no meu trabalho.

A todos os docentes do Curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: Profs. Carlos Rossa Júnior, Elcio Marcantonio Junior, Joni Augusto Cirelli, José Eduardo Cezar Sampaio, Rosemary Adriana Chiéricsi Marcantonio e Silvana Regina Perez Orrico pela formação e orientação.

Aos amigos Alliny, Fabiana, Fausto, Felipe, Fernanda, Giovana, João, Jonatas, João Paulo, Livia, Lucas, Marcel, Marina, Mário, Nicolau, Pablo, Rafael, Rubão, Rubinho, Sabrina, Túlio e Wagner pela amizade sincera e inesquecíveis momentos de convivência.

Ao 'parceiro' Guilherme Oliveira, pelos bons momentos de convivência, pela ajuda nas horas difíceis, pela sua dedicação e paciência durante a execução deste projeto. Obrigado por acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. Rubens Spin Neto, pela valiosa ajuda no desenvolvimento da análise radiográfica.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, pelo apoio e competência com que desempenhou na análise histológica.

Às funcionárias da Disciplina de Periodontia: Regina Lúcia, Maria do Rosário, Zezé e Cláudia pelo respeito, atenção e carinho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e Vice-Diretora, Prof^a. Dr^a. Andreia Affonso Barretto Montandon.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este estudo.

Sumário

Lista de Abreviaturas	09
Resumo	11
Abstract	13
Introdução	15
Proposição	21
Material e Método	22
Resultado	31
Discussão	44
Conclusão	48
Referências	49
Anexos	55

Lista de Abreviaturas

ASU: insaponificáveis de abacate e soja

BBT: área óssea entre as espiras do implante

BIC: contato osso - implante

BMP-2: proteína morfogenéticas óssea 2

COX-2: ciclo-oxigenase 2

DP: desvio padrão

EGCG: epigallocatequina galato

HE: hematoxilina-eosina

IL-1: interleucina 1

iNOS: expressão de óxido nítrico sintase induzida

LPS: lipopolissacarídeo

MMP: matriz metaloproteinase

mm/al: milímetros de alumínio

N: Newtons

PGE2: prostaglandina 2

RI: região de interesse

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TIMP: inibidor de tecidual de metaloproteinase

Paula LGF. Utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração. Avaliação biomecânica, radiográfica, histológica e histomorfométrica em ratos [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

Este estudo avaliou a influência da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração de implantes. Foram utilizados implantes de titânio com 4 mm de comprimento por 2.2 mm de espessura, instalados nas tíbias de ratos. Os 30 ratos foram divididos randomicamente em três grupos: 1- instalação de implantes e administração de soro fisiológico; 2- administração do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja 7 dias antes dos implantes; 3- instalação dos implantes e administração do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja. O medicamento foi administrado por gavagem diariamente, durante 60 dias até o sacrifício. A avaliação se deu através de exames radiográficos (por densidade óssea/milímetro de alumínio), realizados no dia da instalação dos implantes e no dia do sacrifício; análise biomecânica; análise histomorfométrica de contato osso-implante e preenchimento ósseo entre as roscas dos implantes (regiões medulares e corticais ósseas); e análise histológica. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para a verificação da normalidade dos dados, e o teste paramétrico ANOVA complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para comparação dos dados. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 95%. Os resultados obtidos da análise radiográfica nas imagens iniciais, o

grupo II apresentou menores valores de densidade tanto nas regiões de osso cortical como medular comparados aos grupos I e III. Entretanto, as razões de densidade radiográfica do osso nas imagens finais foram sem diferença estatística para todos os grupos. Na análise biomecânica não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Na histologia descritiva e histometria, o grupo I apresentou menor contato osso-implante na área da cortical óssea em relação aos demais grupos. O extrato de óleo insaponificável de abacate e soja teve uma influência positiva na osseointegração dos implantes.

Palavras chaves: fitoterapia, remodelação óssea, implantes dentários.

Paula LGF. Using the oil extract of avocado and soybean unsaponifiables on osseointegration. Biomechanical evaluation, radiography, histology and histomorphometry in rats [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

This study evaluated the influence of the use of oil extract of avocado and soybean unsaponifiables on osseointegration of implants. Titanium implants used were 4 mm long by 2.2 mm thick, installed in the rat tibia. The 30 rats were randomly divided into three groups: 1 - implant placement and administration of saline, 2 - Administration of the extract oil of avocado and soybean unsaponifiable 7 days before the implants, 3 - implant placement and administration of the extract oil Avocado and soybean unsaponifiables. The drug was administered by gavage daily for 60 days until sacrifice. The evaluation was made by radiographic examination (for bone density / mm of aluminum), performed on the day of implant placement and the day of sacrifice, biomechanical, histomorphometric analysis of bone-implant contact and bone fill between the threads of the implants (medullary and cortical bone regions), and histological analysis. The Shapiro-Wilk test was applied to verify the normality of the data, and parametric test ANOVA complemented by Tukey's test was used to compare the data. All tests were applied with a significance level of 95%. The results of radiographic images in the initial group II had lower density in the regions of cortical bone marrow as compared to groups I and III. However, the reasons for radiographic density of bone in the final images were no statistically significant difference for all groups. In

biomechanical analysis no statistical differences between groups. Histologically descriptive and histometric analysis, group I showed lower bone-implant contact in the area of cortical bone in relation to other groups. The extract oil unsaponifiable of avocado and soybean had a positive influence on osseointegration of implants.

Keywords: phytotherapy, bone remodeling, dental implants.

Introdução

A osseointegração surgiu há mais de 40 anos por meio de pesquisas de Bränemark, onde estabelecia a união anatômica e funcional entre um parafuso de titânio e osso vivo e remodelado⁹. Desde então, este fenômeno biomecânico tem sido estudado extensivamente definindo conceitos e aperfeiçoando técnicas, viabilizando cada vez mais o tratamento com implantes osseointegráveis.

A conquista da osseointegração possibilitou a ancoragem de vários tipos de próteses, criando alternativas para reabilitação de pacientes com edentulismo total, parcial e unitário. Atualmente, os implantes são considerados a melhor opção de tratamento em função do alto índice de sucesso⁶, além de restabelecer a estética, fonética e função^{1,6}.

Apesar da previsibilidade dos implantes osseointegráveis, alguns fatores podem induzir ao insucesso, como a qualidade óssea que é condição clínica essencial para que os implantes possam ser corretamente instalados. Em pacientes com osso trabecular fino ocorre dificuldade na obtenção da estabilidade primária o que reduz as taxas de sobrevivência dos implantes. Já nos casos de osso cortical denso observamos a facilidade de ocorrer supraaquecimento durante o processo de osteotomia³³.

A topografia e a superfície de implantes de titânio têm sido muito pesquisadas. Modificações na superfície dos implantes são propostas com o objetivo de aumentar a área de contato entre o osso e o implante, criando maior rugosidade, aumentando a retenção do coágulo, estimulando o processo de cicatrização⁴⁶. Estas modificações levam a possibilidade de sucesso, principalmente nos casos de característica óssea desfavorável²⁸.

Os problemas sistêmicos também são considerados fatores de risco para instalação de implantes osseointegrados, principalmente porque podem interferir no processo de cicatrização.

Dentre estes problemas, a diabetes é uma das doenças que afetam diretamente o processo de cicatrização, uma vez que é um distúrbio do metabolismo característico pela hiperglicemia. As complicações como a alteração na vascularização¹⁷, podem levar a um aumento do risco de infecção e/ou comprometimento do processo de formação e remodelação óssea, inerentes a osseointegração. Embora tenha uma influência negativa na osseointegração, a diabetes não contra-indica a cirurgia, desde que o paciente esteja sob controle com insulina e/ou dieta^{34,42}.

O tabagismo também pode alterar o processo de cicatrização, causando vasoconstricção periférica, diminuindo a atividade dos leucócitos, diminuindo a resistência a inflamações e infecções, e comprometendo potencialmente a cicatrização dos ferimentos²⁹. Nos pacientes que fazem uso de cigarro, para melhorar a taxa de sobrevivência dos implantes, estes devem abandonar ou interromper o hábito de fumar⁵.

Alguns medicamentos atuam no metabolismo ósseo, e podem interferir na previsibilidade da osseointegração. São exemplos destes medicamentos: imunossupressores, bifosfonatos e fitoterápicos.

A ciclosporina administrada em doses imunossupressoras tem demonstrado aumento no metabolismo ósseo, causando um desequilíbrio entre formação e reabsorção, provocando osteopenia¹³. Estes efeitos podem afetar o processo de osseointegração, diminuindo a formação óssea nas espiras do implante, comprometendo sua estabilidade⁴⁰.

O alendronato é um medicamento muito utilizado no tratamento da osteoporose. É um inibidor da ação osteoclástica, com capacidade de se aderir na matriz óssea mineral, e permanecendo durante anos²⁷. Esta disfunção no processo de reabsorção óssea interfere diretamente na osseointegração, podendo levar à ocorrência de osteonecrose dos maxilares^{14,32}.

Terapias fitoterápicas e homeopáticas têm sido muito utilizadas. O medicamento *Symphytum officinale* foi avaliado em um estudo com implantes em ratos, onde os autores observaram um aumento no torque de remoção e na densidade óssea radiográfica ao redor de implantes de titânio⁴³.

O medicamento fitoterápico Piascledine[®]300 é um composto de óleos insaponificáveis de abacate e de soja (ASU), extraídos do fruto e das sementes dessas plantas. É indicado no tratamento dos quadros dolorosos de artrose de quadril e joelho, como coadjuvante do tratamento das periodontites e gengivites. Esses insaponificáveis comprovaram ser eficientes em osteoartroses dolorosas, nas quais diminuíram o curso da doença. Age diminuindo em cerca de 50% a atividade da collagenase, impedindo o efeito destrutivo da interleucina-1 β na cartilagem articular, permitindo a restauração da produção normal de colágeno e da malha de tecido conjuntivo (vide bula, Anexo 1).

Mauviel et al.³¹ estudaram o efeito do ASU sobre a atividade colagenolítica em culturas de células sinoviócitos reumatóide humanas e condrócitos articular de coelhos tratados com interleucina-1. Os autores observaram que a incubação dos dois tipos de células com o Piascledine, expostos a IL-1 impede parcialmente o efeito desta proteína. Estes dados sugerem um papel potencial do Piascledine para limitar os efeitos deletérios da interleucina-1 em doenças osteoarticulares, reduzindo a capacidade desta citocina de estimular a produção de collagenase pelos sinoviócitos e condrócitos.

Em 1998, Henrotin et al.¹⁹ investigaram os efeitos de misturas de abacate e soja insaponificáveis em metaloproteinases, citocinas e produção de prostaglandina E₂ por condrócitos articulares humanos. O ASU foi misturado em três concentrações diferentes: 1:2 (A1S2), 2:1 (A2S1) ou 1:1 (A2S2). Os condrócitos foram isolados e cultivados na ausência ou presença de interleucina-1 β (IL-1 β), e testados nas diferentes concentrações do ASU. Todas as concentrações do ASU reduziram a produção de estromelisina, interleucina-6, interleucina-8 e prostaglandina E₂ nos condrócitos. Estes achados sugerem um papel potencial do ASU na redução dos efeitos deletérios da IL-1 β sobre a cartilagem.

Kut-Lasserre et al.²⁴ estudaram os efeitos do ASU em gelatinase A (MMP-2), estromelisina 1 (MMP-3), e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2) secretados em culturas de fibroblastos humanos. Fibroblastos gengivais foram cultivados em diferentes concentrações de ASU, presença ou ausência de IL-1 β , MMP-2 e MMP-3 foram detectadas e quantificadas por meio de cultura após a análise zimográfica e de imagem. TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 e MMP-3 também foram evidenciadas por dot blotting e quantificadas por análise de imagem. Os autores concluíram que o medicamento tem uma ação potencial na prevenção dos efeitos deletérios da IL-1 β que ocorrem durante as doenças periodontais.

Adriamanalijaona et al.³ investigaram o efeito in vitro do extrato insaponificável de abacate e soja na expressão de TGF- β 1, TGF- β 2 e proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) pelo ligamento periodontal e osso alveolar humano, na presença de proteínas IL-1 β . As células do ligamento e osso foram incubadas, com ASU na presença ou ausência de IL-1 β . O ASU estimulou a expressão de TGF- β 1, TGF- β 2 e BMP-2. Estes resultados sugerem que o ASU pode exercer uma ação preventiva sobre os efeitos deletérios exercidos pela IL-1 β na doença periodontal.

O estudo de Au et al.⁴ avaliou os efeitos do ASU nos mediadores pró-inflamatórios em condrócitos articulares e células monócitos - macrófagos. Os resultados obtidos identificaram que o ASU reduziu a expressão de TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS em condrócitos LPS-ativado. Estas observações justificam os efeitos anti-inflamatórios do ASU, que diminui a dor em pacientes com osteoartrite.

Os efeitos metabólicos do ASU em condrócitos articulares foram estudados por Lippiello et al.³⁰ Com o intuito de esclarecer o conteúdo do ASU, amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria massa. A avaliação da atividade anti-inflamatória do medicamento foi testada em condrócitos bovinos in vitro, por meio da medida de redução da síntese de IL-1, de PGE2 induzida e metaloproteases. O ASU foi efetivo na inibição da IL-1 induzida, atividade da MMP-3 e síntese da PGE2.

Heinecke et al.¹⁸ avaliaram o efeito anti-inflamatório do ASU e da epigalocatequina galato (EGCG) na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e na produção da prostaglandina E₂ (PGE₂) em citocinas ativadas de condrócitos equinos. Os resultados demonstraram que o ASU e a EGCG inibiram a expressão da COX-2 e a produção de PGE₂ em condrócitos ativos.

Pavelka et al.³⁷ apresentaram um relatório com dados epidemiológicos sobre o impacto da osteoartrite, e evidenciou os efeitos do ASU. O medicamento tem ação anti-inflamatória, inibindo mediadores destrutivos (IL-1 e metaloproteinasas), e estimula mediadores anabólicos (TGF- β). Relatou a eficácia e segurança do medicamento sendo recomendado especialmente para osteoartrites dolorosas.

O processo de osseointegração ocorre em três estágios básicos (inflamatório, fibroblástico e remodelador). Logo após a instalação do implante tem início a

formação do coágulo (grande número de células inflamatórias) que após alguns dias é substituído por um tecido de granulação (rico em neutrófilos e macrófagos). Neste tecido de granulação, os macrófagos de reparação e as células mesenquimais indiferenciadas irão iniciar a produção e liberação de fatores de crescimento, que estimulam a formação de um tecido conjuntivo provisório (fibroblastos), e posteriormente se transforma em osteóide (osso primário). Terminando com a remodelação, onde o osso primário é substituído por osso lamelar^{38,28}.

Em virtude do ASU estar indicado no tratamento de osteoartrites, que é uma doença imunoinflamatória induzida por citocinas pró-inflamatórias, e estudos na área médica terem demonstrado a ação de reparo deste fármaco em tecido conjuntivo (estroma, cartilagem e osso) devido a estímulos na secreção de fatores de crescimento e supressão da secreção de citocinas pró-inflamatórias, supõe-se que esse medicamento pode exercer algum efeito sobre o processo de osseointegração dos implantes dentários.

Proposição

O objetivo deste projeto foi avaliar, em ratos, as respostas teciduais da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja nos tecidos periimplantares na osseointegração. Para isso foram avaliadas as seguintes hipóteses:

HO - A utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja não interfere na osseointegração;

H1 - A utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja interfere na osseointegração.

Material e Método

MODELO ANIMAL

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimento Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo CEEA 17/2009, Anexo 2).

Foram utilizados 30 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com peso variando entre 250g a 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas, tendo acesso *ad libitum* à água e ração sólida, em ambiente com temperatura controlada ($\pm 21^\circ$), umidade ($\pm 75\%$) e ciclos de luz (12/12h).

GRUPOS

Os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos:

GRUPO I- CONTROLE- instalação de implantes nas tíbias e administração de soro fisiológico por gavagem.

GRUPO II- administração de extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine[®]300, Expanscience Lab, France) aplicado 0,6g/Kg/dia por gavagem⁴⁷ 7 dias antes da instalação dos implantes na região da tíbia.

GRUPO III- administração de extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine[®]300, Expanscience Lab, France) aplicado 0,6g/Kg/dia por gavagem⁴⁷ no dia da instalação dos implantes na tíbia.

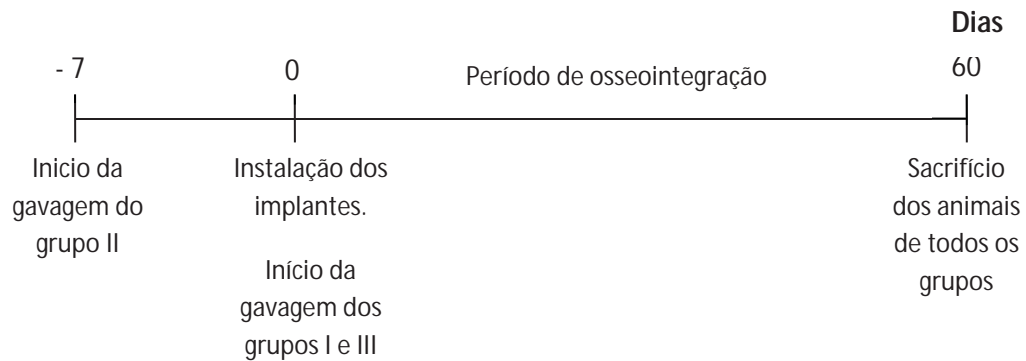


FIGURA 1 - Fluxograma dos grupos.

PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Antes do início dos procedimentos com os animais, foi aguardado um período de sete dias para instalação e adequação dos animais ao ambiente do biotério; após os animais foram submetidos à cirurgia para instalação dos implantes na metáfise tibial bilateral, de acordo com a Figura 1. Para isso os animais foram anestesiados com uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08ml/100g de massa corporal (Ketamina Agener - Agener União) e 0,04ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Xilazina, Rompum - Bayer). Posteriormente, foram submetidos à tricotomia da região interna das patas e antissepsia com solução de iodopovidona (PVPI Tópico 10% - Rioquímica).

Após a sedação os animais foram anestesiados localmente com Cloridrato de Mepivacaína 2% com vasoconstritor adrenalina 1:100.000 (Mepiádre, DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantendo hemostasia do campo operatório. Uma incisão em planos de aproximadamente 10 mm foi realizada e o tecido ósseo exposto. As perfurações foram realizadas com motor elétrico (Omega, Dentscler), programado a 1200rpm,

sob irrigação abundante com solução salina estéril, por meio de uma fresa lança (diâmetro 2.0mm), para acomodar um mini implante de titânio de 4mm de comprimento por 2.2mm de diâmetro. O implante foi instalado com contra ângulo (20:1, Anthogyr) e motor ajustado em 15rpm e 10N. Cada animal recebeu um implante em cada tibia. A sutura foi realizada em planos, internamente com fio reabsorvível (Vicryl 5.0, ETHICON, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) e externamente com fio de seda (Seda 4.0, ETHICON, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil), de acordo com a Figura2.

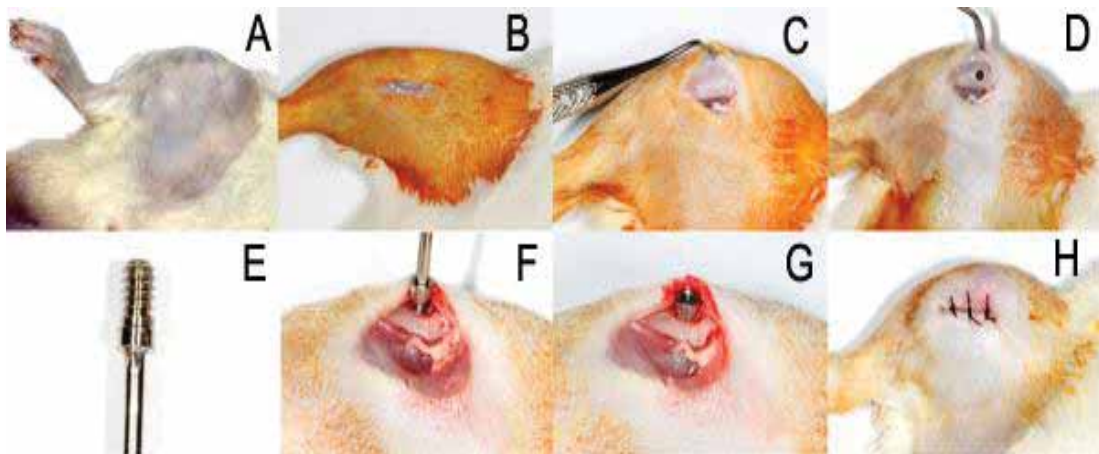


FIGURA 2 – Procedimentos cirúrgicos.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção em dose única (0,1ml/Kg) por via intramuscular de penicilina associada à estreptomicina (Multibiótico Pequeno Porte, Vitalfarma), e analgésico dipirona sódica (Dipirona Ibaso 50% - Ibaso) em dose única (0,1ml/Kg) por gavagem.

Decorrido o período de 60 dias necessário à osseointegração dos implantes¹⁰, todos os animais foram sacrificados. Para cada grupo os animais foram

randomicamente subdivididos e as tíbias foram separadas de acordo com as avaliações, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Divisão dos animais

GRUPOS	I	II	III
NÚMERO DE ANIMAIS	10	10	10
ANÁLISE RADIOGRÁFICA, BIOMECÂNICA E HISTOLÓGICA	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS

ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As imagens radiográficas foram obtidas através de um sistema de imagem digital direta – Schick CDR (Schick Technologies Inc, Island City, NY, EUA), realizadas imediatamente após a cirurgia de instalação dos implantes (imagem inicial) e no dia do sacrifício dos animais (imagem final). As tíbias eram fixadas em um posicionador (figura 3), com o longo eixo vertical do implante posicionado perpendicularmente ao feixe central de raio-X e paralelo ao sensor, numa distância focal de 40cm do objeto. Com um aparelho de raio-X GE 100 (General Electrics, EUA) o sensor foi exposto à tomada radiográfica ajustado em 70KVp e 10mA, com tempo de exposição de 0,3segundos.

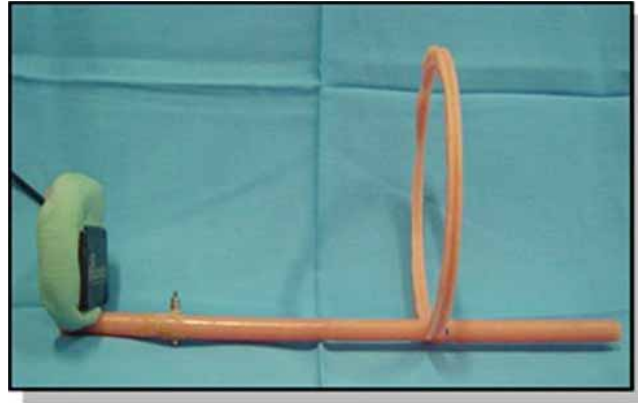


FIGURA 3 - Posicionador de radiografia.

As imagens foram importadas para o software de imagem digital (Image J, Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA) e exibido em um monitor de tela plana de 15 polegadas S-VGA (1280 x 960 pixels de resolução). Densidade mineral óssea foi avaliada utilizando análise de histograma dos tons de cinza em uma área de 4 x 4 pixels (1mm^2) para as regiões de interesse (RI), ou seja, osso cortical e osso medular de ambos os lados do implante. Como pontos de referência, o ponto médio da plataforma do implante e do segundo segmento do implante foram utilizados. Um zoom de 300% foi usado para facilitar o desenho da área. Os cálculos da densidade óssea foram realizados pelo primeiro ponto a obter os tons de cinza da RI e depois dividindo-os pelos tons de cinza de uma escala de alumínio, usada como uma RI de referência. A RI de referência também foi medida em uma área de 4 x 4 pixels, colocada sobre uma etapa da divisão correspondente a uma profundidade de 10 mm de alumínio, a fim de compensar as diferenças entre as exposições (Figura 4).

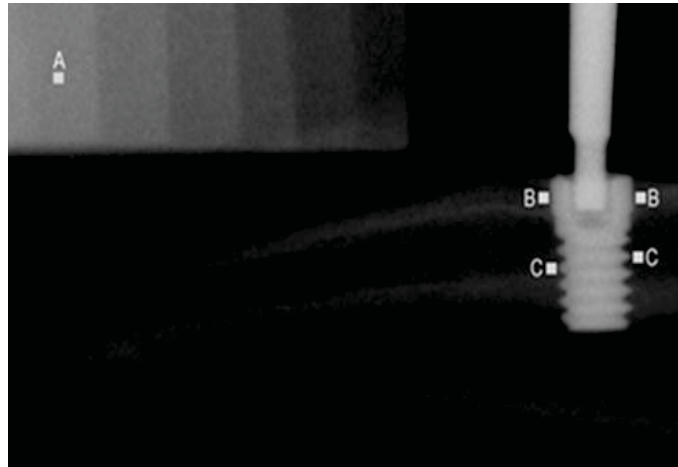


FIGURA 4 - Radiografia digitalizada. A - escala de alumínio, B - osso cortical e C - osso medular.

Todos os resultados foram obtidos em tons de cinza (0 - 255) dentro da RI. As imagens foram randomizadas, mascaradas, e medidas por outro pesquisador. Trinta por cento da amostra foi medida em duplicata para calcular a reprodutibilidade do avaliador, uma semana após a primeira medição.

A reprodutibilidade avaliadora também foi acessada usando os dados brutos e teste de correlação de Pearson. Dois valores (lado direito e lado esquerdo) da RI cortical e da RI medular foram obtidos para cada implante, e a média destes dois valores foram utilizadas para representar o valor da RI espacial em cada implante. Finalmente, uma relação obtida a partir da divisão de cada RI osso específico e a RI de referência foi utilizada.

ANÁLISE BIOMECÂNICA

Após o sacrifício, as tíbias foram removidas e estabilizadas em uma pequena morsa. Uma chave hexagonal de 1.17mm (Conexão Sistemas de Prótese) foi conectada tanto no implante como no torquímetro (Tohnic, Japan). Realizou-se um

movimento anti-horário para que a força (N) necessária para o rompimento da interface osso-implante fosse obtida e registrada (Figura 5). Depois de gravar os valores de torque, o implante foi completamente desaparafusado e as tíbias separadas para análise histológica. As avaliações desses valores foram realizadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.



FIGURA 5 - Torquímetro conectado ao implante.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As tíbias que não passaram pela análise biomecânica foram utilizadas para análise histomorfométrica. As peças foram imersas em paraformaldeído 4% e processadas de acordo com o método descrito por Donath¹¹. Os blocos foram desidratados em uma série crescente de etanóis (60 – 100%) e posteriormente infiltrados e polimerizados em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & CO., Wehrheim, Alemanha). Os blocos contendo o implante e o tecido ósseo foram cortados em um ponto central usando um sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As seções finais que compuseram as lâminas foram de aproximadamente 45 µm de espessura

e corados com azul de Stevenel associado à fucsina ácida e analisadas em um microscópio óptico (DIASTAR – Leica Reichert & Jung products, Alemanha). As avaliações histomorfométricas foram realizadas com o software para análise de imagem (Image J, Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA). As porcentagens de contato osso-implante (BIC) e de área óssea entre espiras (BBT) foram avaliadas separadamente para a região cortical e endocondral.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

As tíbias que tiveram os implantes removidos, foram fixadas em paraformaldeído 4% (48 horas), lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um período de 8 semanas, com trocas semanais. Depois foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados paralelos ao longo eixo do implante. Os cortes com espessura de 4 μ m foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

Foram avaliadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo, processos de reabsorção óssea, assim como presença de células inflamatórias, utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany). As avaliações foram realizadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo de amostra, foi utilizado como variável primária o torque de remoção considerando que a diferença mínima entre os grupos deveria ser de 4N para que

ocorressem diferenças estatisticamente significativas com alfa no valor de 0.05 e poder do teste de 80%. O teste ANOVA determinou um número mínimo de nove animais em cada grupo para a determinação de diferenças estatisticamente significativas.

Na análise radiográfica foi utilizado o teste de normalidade (D'Agostino e Pearson), para dados paramétricos, o teste t pareado para acessar diferenças entre as imagens iniciais e as imagens finais, no mesmo grupo / período de avaliação e uma análise de variância - ANOVA seguido por teste de Tukey foi utilizado para avaliar diferenças na densidade óssea radiográfica entre os grupos.

Para a análise biomecânica, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para a verificação da normalidade dos dados. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para comparação dos dados. Os testes tiveram diferenças estatisticamente significantes em $p \leq 0,05$.

Na análise histomorfométrica os dados fornecidos eram numéricos e dessa forma o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar se os dados se distribuíram de acordo com a normalidade. O teste de normalidade determinou que os dados respeitavam o teorema da distribuição central e dessa forma testes paramétricos foram aplicados para a análise estatística inferencial dos dados ($p > 0.05$). O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para comparação dos dados, complementado pelo teste de Turkey. Todos os testes desse estudo foram executados com o software Biostat 5.0 (Belém, PA, Brasil) e aplicados com nível de significância de 95%.

Resultado

Durante o período de cicatrização (60 dias) os animais não apresentaram alterações nos tecidos moles ou fraturas das tíbias. A avaliação de reprodutibilidade foi elevada ($r^2 = 0.901$), assegurando a confiabilidade dos dados utilizados.

ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Para RI do osso cortical (Figura 6 e Tabela 2), ao comparar as imagens inicial e final, o grupo II apresentou um aumento da densidade óssea estatisticamente significativa ($p \leq 0.01$). Para os grupos I e III, não foram observadas diferenças entre as imagens iniciais e finais. Comparando os três grupos em conjunto, considerando as imagens iniciais, o grupo II apresentou os menores valores de densidade óssea, e este foi estatisticamente diferente do grupo I ($p \leq 0.01$). Considerando as imagens finais, as razões de densidade radiográfica do osso foram semelhantes para todos os grupos avaliados.

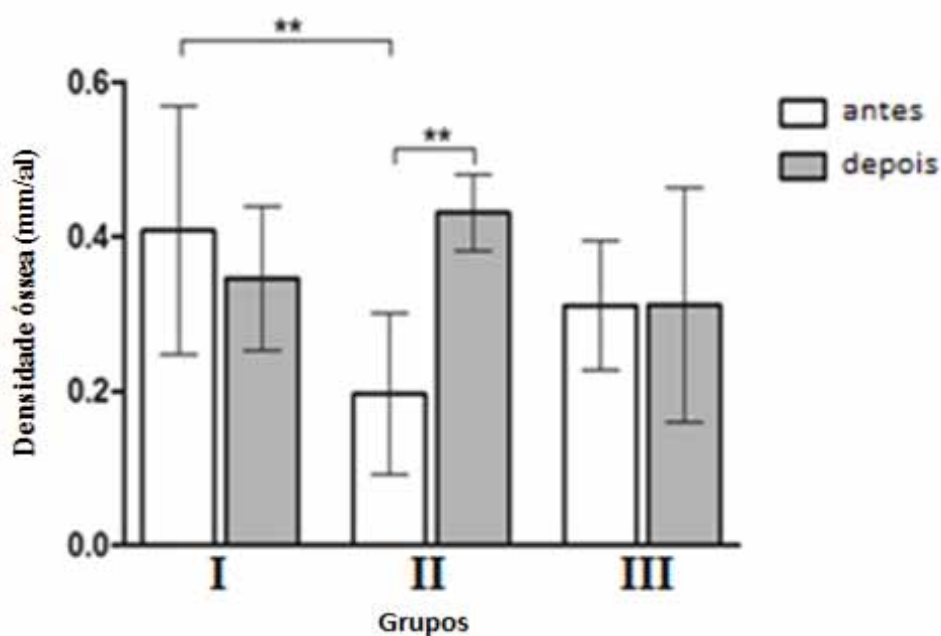


FIGURA 6 - Relação das densidades (média \pm DP), das RIs no osso cortical. (**) $P \leq 0.01$.

Para RI do osso medular (Figura 7 e Tabela 2), quando comparados os valores iniciais e finais da densidade óssea radiográfica, os resultados foram semelhantes às observadas no osso cortical, mas não houve diferença estatística na comparação das RIs dentro do grupo I ($p \leq 0.05$) e do grupo II ($p \leq 0.01$). Considerando as imagens iniciais de todos os três grupos em conjunto, o grupo II novamente apresentou os menores valores de densidade óssea, e esta foi estatisticamente diferente do grupo I ($p \leq 0.001$) e III ($p \leq 0.05$). Não foram observadas diferenças nos valores finais obtidos para todos os grupos.

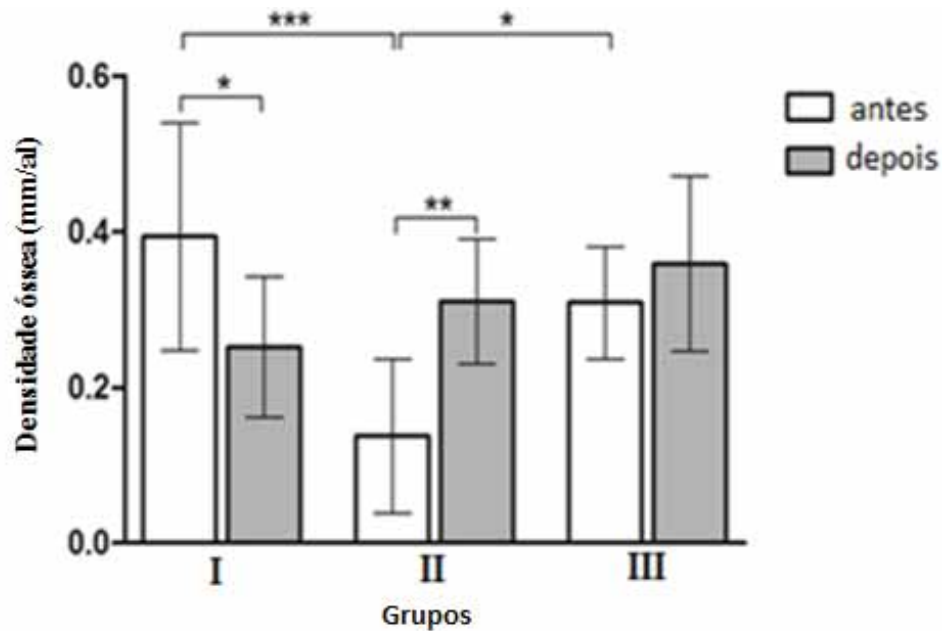


FIGURA 7 - Relação das densidades (média \pm DP) das RIs no osso medular. (*) $P \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$.

Se levarmos em conta a média entre os valores das RIs cortical e medular (Figura 8 e Tabela 2), ao comparar as imagens inicial e final, o grupo II apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0.01$). Para os grupos I e III, não foram observadas diferenças entre as imagens iniciais e finais. Considerando os três grupos em conjunto, no

grupo II as imagens iniciais apresentaram os menores valores, sendo considerado estatisticamente diferente do grupo I ($p \leq 0.001$) e III ($p \leq 0.05$). Novamente, não foram observadas diferenças nos valores obtidos para o índice final em todos os grupos.

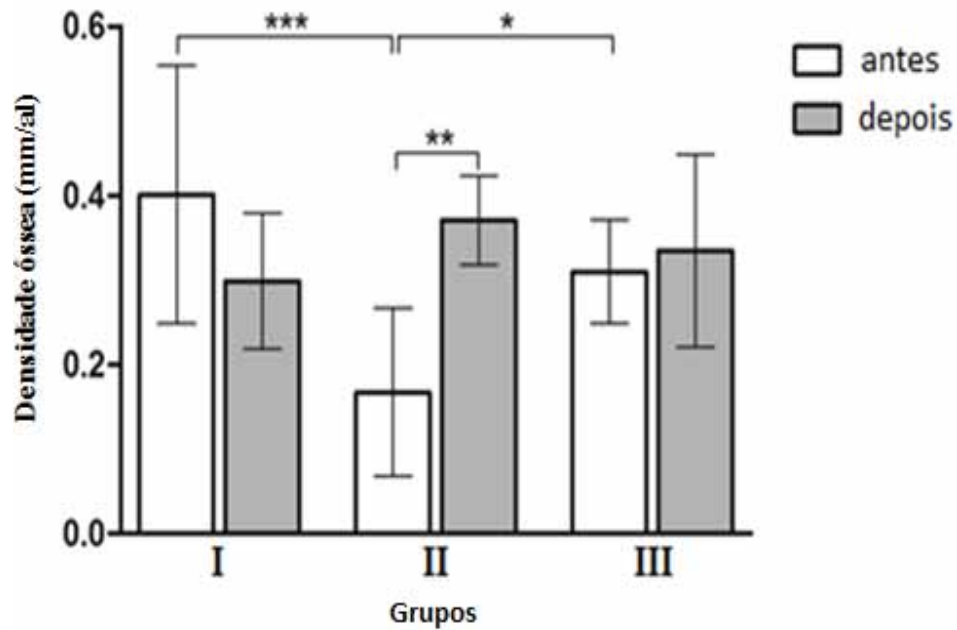


FIGURA 8 - Relação das densidades (média \pm DP), considerando o valor médio entre as RIs corticais e medulares. (*) $P \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$.

Tabela 2 - Relação das densidades (média \pm DP), na avaliação das RIs

Osso	GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
cortical	0.41 \pm 0.16	0.35 \pm 0.09	0.20 \pm 0.10	0.43 \pm 0.05	0.31 \pm 0.08	0.31 \pm 0.15
medular	0.39 \pm 0.14	0.25 \pm 0.09	0.14 \pm 0.10	0.31 \pm 0.10	0.31 \pm 0.07	0.36 \pm 0.11
geral	0.40 \pm 0.15	0.30 \pm 0.08	0.17 \pm 0.10	0.37 \pm 0.05	0.31 \pm 0.06	0.33 \pm 0.11

ANÁLISE BIOMECÂNICA

Foi verificado que o grupo III apresentou 20.67 ± 1.43 N de torque de remoção, seguido pelo grupo I com 19.05 ± 2.14 N e pelo grupo II com 18.35 ± 4.02 N. Porém, o teste ANOVA ($p = 0.2$) não demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Os resultados da estatística descritiva estão expressos na Tabela 3 e na Figura 9.

Tabela 3 - Média e desvio padrão do torque de remoção (N)

Grupos	Média (N)	Desvio Padrão
Grupo I (Controle)	19.05	2.14
Grupo II (Medicação antes)	18.35	4.02
Grupo III (Medicação durante)	20.67	1.43

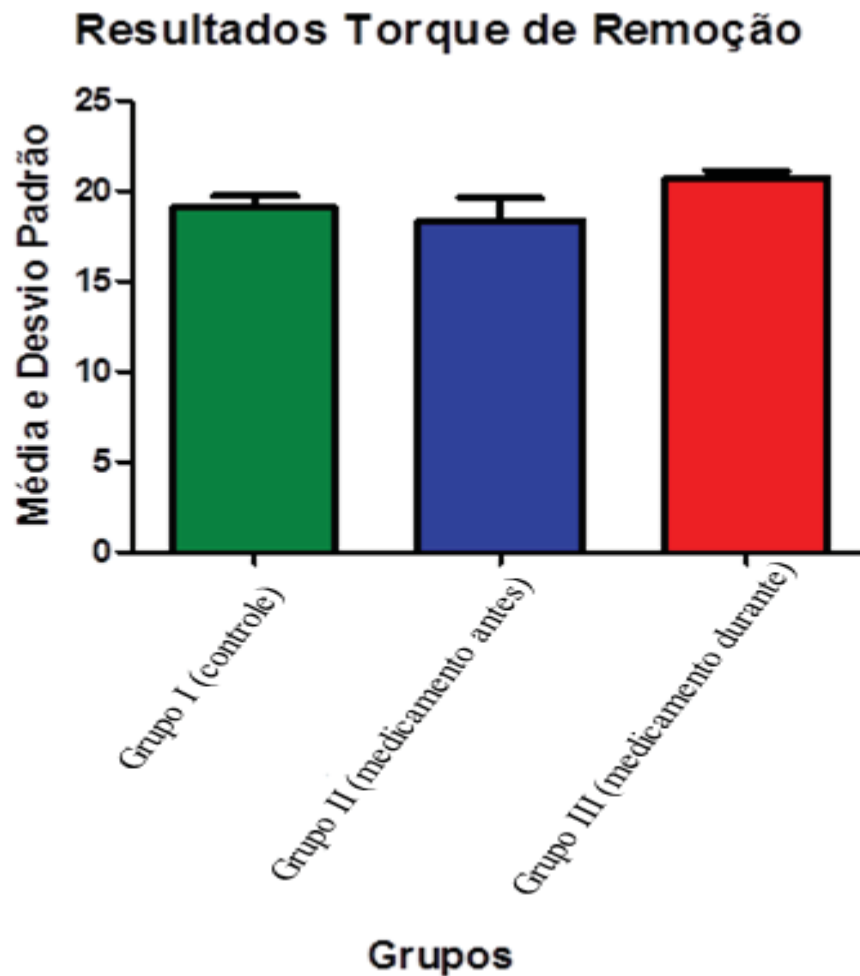


FIGURA 9 - Média e desvio padrão dos resultados de torque de remoção (N).

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Nesse estudo foi avaliado histometricamente o contato osso-implante (BIC) e o preenchimento de roscas por tecido ósseo (BBT). Para a análise da estatística inferencial foi utilizado os dados do BIC e BBT levando em conta a avaliação geral e dividindo essa avaliação de acordo com a região óssea (cortical e medular). A Tabela 4 descreve as médias e desvio padrão dos grupos em relação à porcentagem do BIC e BBT dentro das roscas dos implantes de forma geral não levando em consideração as diferentes regiões ósseas. O teste

paramétrico de Anova demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 4 - Média e desvio padrão das porcentagens de contato osso implante e do preenchimento ósseo dentro das rocas dos implantes nos 3 grupos avaliados

Grupo	Contato - Osso Implante	Preenchimento de rosca
Grupo I	55.32 ± 9.69	59.52 ± 16.40
Grupo II	56.52 ± 12.68	62.16 ± 15.36
Grupo III	62.22 ± 9.80	64.10 ± 10.75

A Tabela 5 demonstra as médias e os desvios padrões do contato osso implante e do preenchimento ósseo dentro das rocas dos implantes nos 3 grupos avaliados na região cortical. O teste de Anova complementado pelo teste de Tukey demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, onde os grupos II e III apresentaram maior contato Osso-Implante que o grupo I ($p < 0.05$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto ao preenchimento ósseo dentro das roscas dos implantes.

Tabela 5 - Média e desvio padrão das porcentagens de contato osso implante e do preenchimento ósseo dentro das rocas dos implantes nos 3 grupos avaliados na região cortical

*Grupos Estatisticamente Superiores ao Grupo I ($p < 0.05$) - Teste de Tukey.

Grupo	Contato - Osso Implante	Preenchimento de rosca
Grupo I	59.51 ± 9.68	70.24 ± 14.28
Grupo II	71.95 ± 13.01*	74.77 ± 17.26
Grupo III	73.81 ± 9.01*	78.90 ± 9.94

A Tabela 6 demonstra as médias e desvios padrões quanto ao contato osso implante e do preenchimento ósseo dentro das rocas dos implantes nos 3 grupos avaliados na região medular, de acordo com as Figuras 10, 11 e 12. O teste de Anova demonstrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma das análises executadas.

Tabela 6 - Média e desvio padrão das porcentagens de contato osso implante e do preenchimento ósseo dentro das rocas dos implantes nos 3 grupos avaliados na região medular

Grupo	Contato - Osso Implante	Preenchimento de rosca
Grupo I	39.71 ± 19.00	38.71 ± 17.97
Grupo III	46.69 ± 15.60	46.84 ± 14.13
Grupo II	44.87 ± 18.52	47.77 ± 14.83

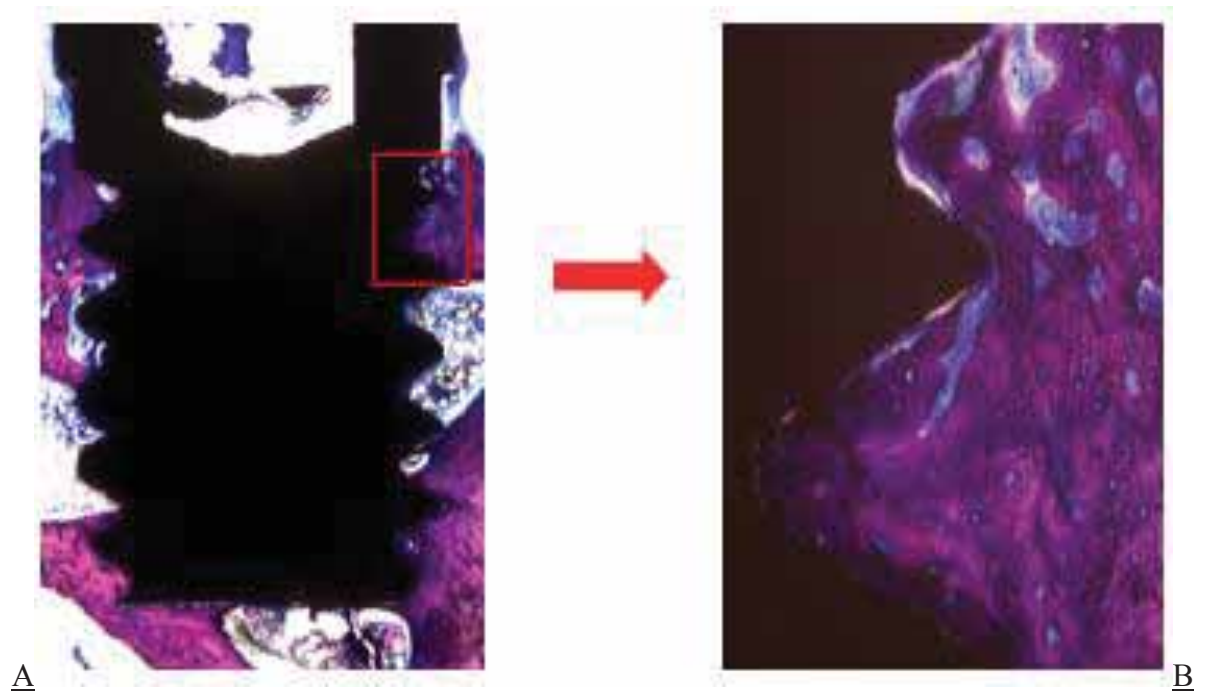


FIGURA 10 - Imagem do grupo I, interface osso-implante na região cortical: A(X2,5);
B(X10); azul de Stevenel e fucsina ácida.

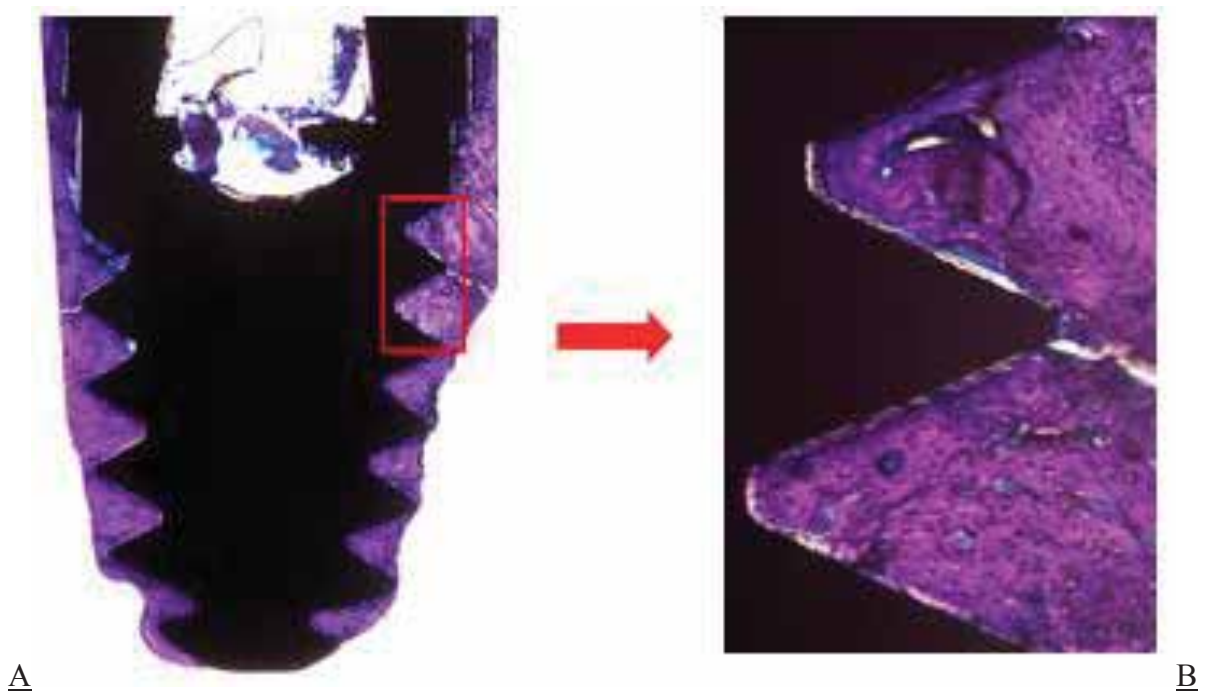


FIGURA 11 - Imagem do grupo II, interface osso-implante na região cortical: A(X2,5);
B(X10); azul de Stevenel e fucsina ácida.

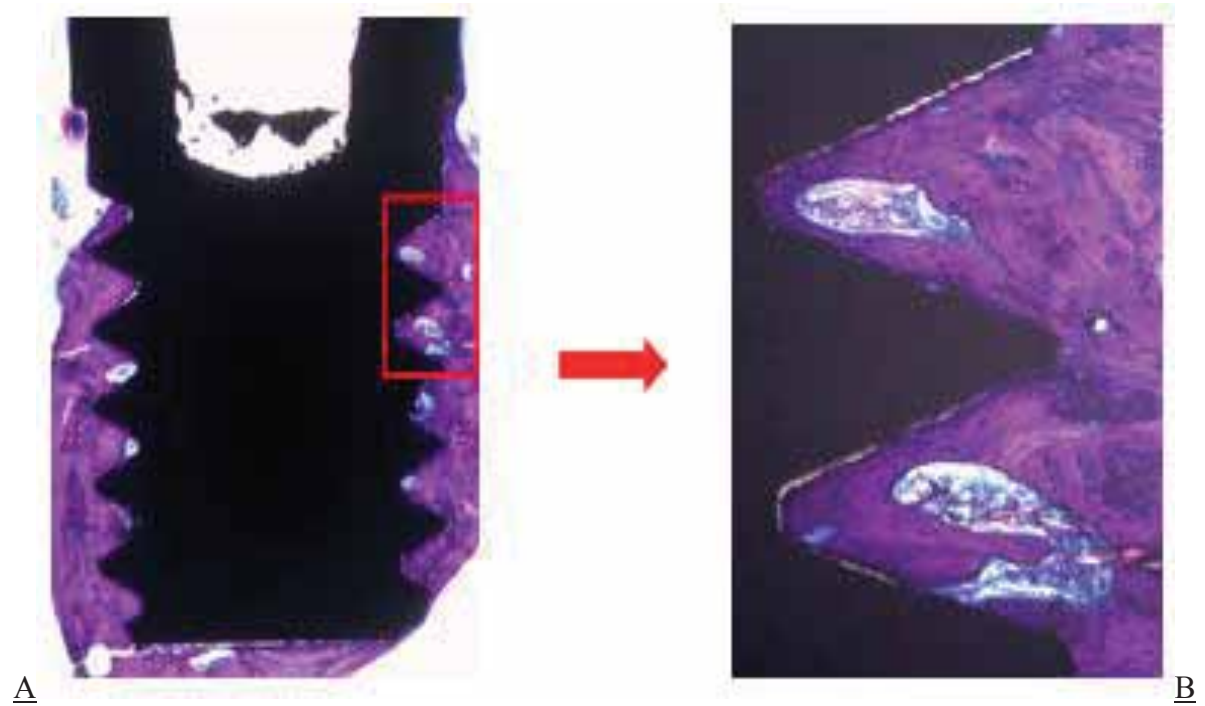


FIGURA 12 - Imagem do grupo III, interface osso-implante na região cortical: A(X2,5); B(X10); azul de Stevenel e fucsina ácida.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes analisados (Figuras 13, 14 e 15) revelaram cortes longitudinais de osso compacto descalcificado, composto por lamelas circunferenciais envolvendo figuras vasculares, lamelas intersticiais, osteócitos que se apresentavam com formato lenticular ocupando espaços naturalmente achatados denominados de lacunas, que por sua vez estavam envolvidas por matriz osteóide (não calcificada). Na periferia, em algumas regiões, observa-se que o tecido ósseo estava envolvido por periósteo. Internamente, em determinadas regiões observa-se tecido medular caracteristicamente basofílico, ocupando os espaços medulares. No centro de todos os cortes observa-se área negativa ocupada parcialmente por hemácias e

tecido basofílico semelhante ao tecido medular. Na interface observa-se tecido ósseo neoformado, formando reentrâncias e saliências que em conjunto tinha o formato de rosca. Nos cortes dos grupos II e III o aspecto do tecido ósseo neoformado era semelhante ao tecido ósseo circunvizinho excetuando-se o grupo I (controle) que apresentava áreas de tecido ósseo delimitando figuras vasculares no interior de lacunas mais amplas que os demais grupos, inúmero osteócitos morfológicamente mais arredondados, assim como grande quantidade de linhas de reversão. Nesse grupo era possível observar junto à superfície osteoblastos achatados formando fileira única justapondo-se ao tecido ósseo. Os cortes dos demais grupos eram semelhantes.

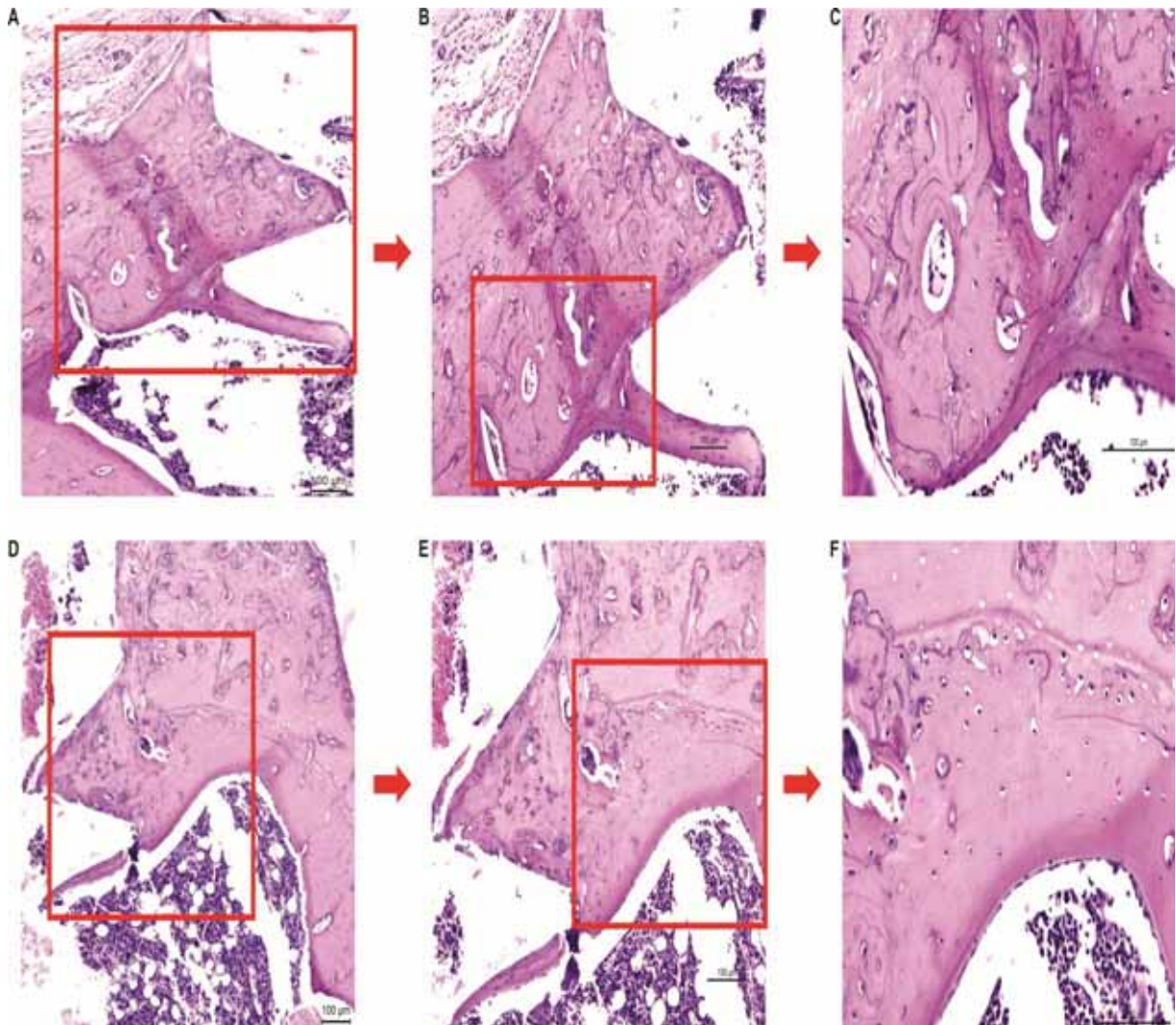


FIGURA 13 - Imagens do grupo I - observamos saliências ósseas em forma de rosca, formada por tecido ósseo neovascularizado do grupo de animais controle, mostrando principalmente nas figuras B e C inúmeros osteócitos e marcantes linhas de reversão. A(X5); B(X10); C(X20); D(X5); E(X10); F(X20); HE.

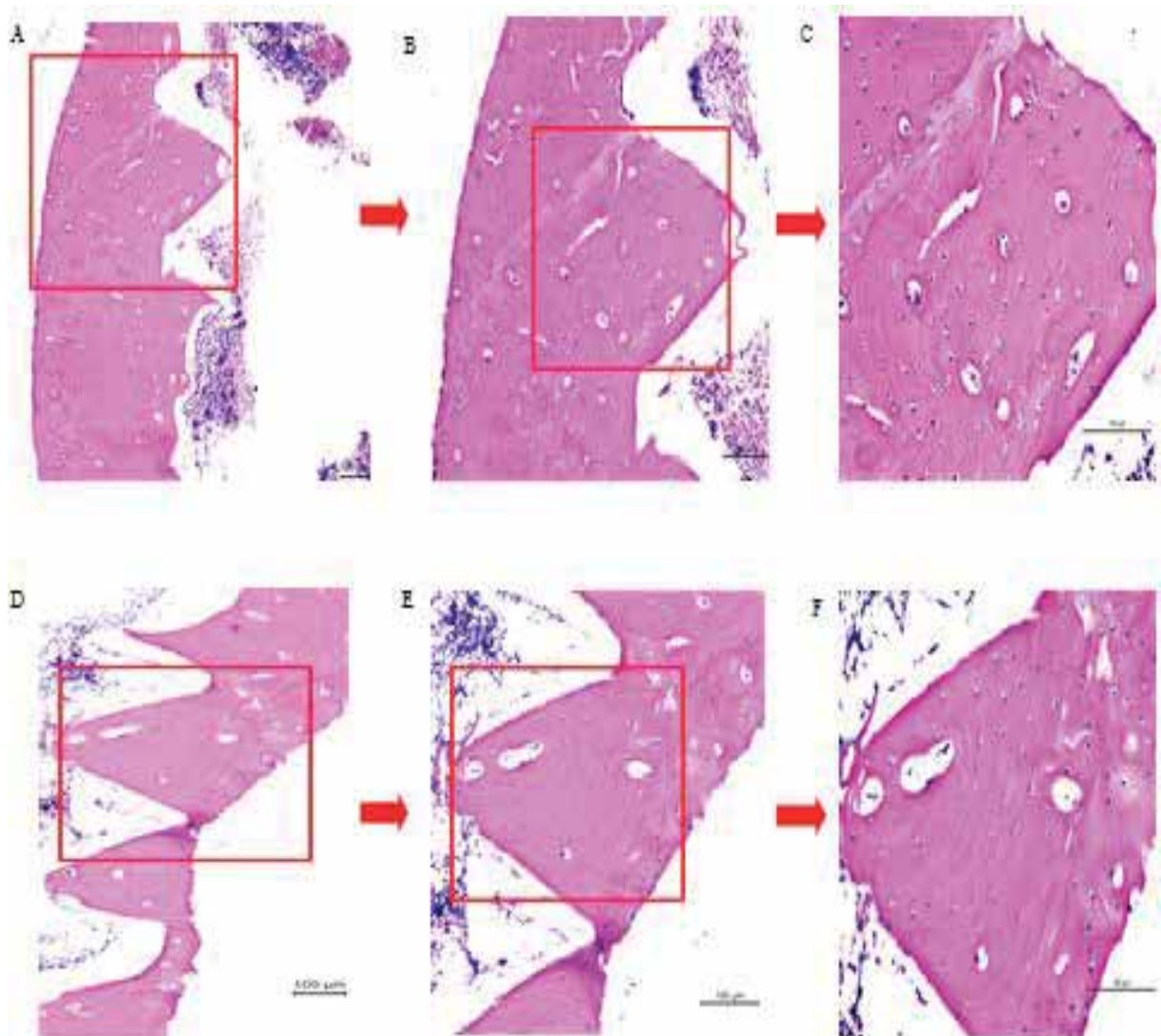


FIGURA 14 - Imagens do grupo II - observamos saliências ósseas em forma de rosca, formadas por tecido ósseo neoformado do grupo de animais tratados com Piascledine[®] 7 dias antes do procedimento cirúrgico e por um período de 60 dias. O tecido ósseo aparenta maior maturação, contendo inúmeros osteócitos e sem a presença de linhas de reversão. A(X5); B(X10); C(X20); D(X5); E(X10); F(X20); HE.

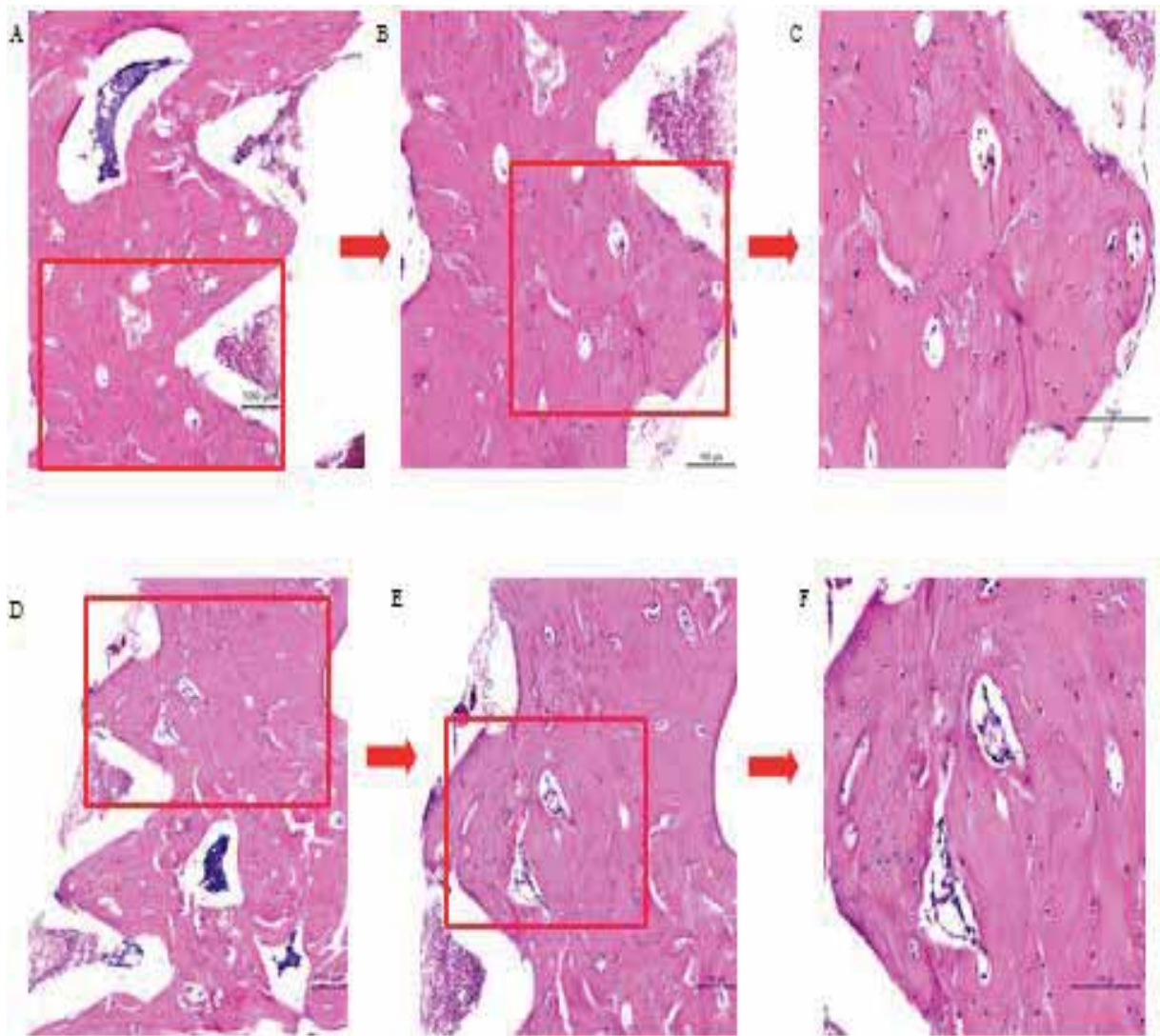


FIGURA 15 - Imagens do grupo III - tecido ósseo neoformado com saliências em forma de rosca do grupo de animais tratados com Piascledine[®] por um período de 60 dias. O tecido ósseo apresenta áreas claras ocupadas por vasos sanguíneos, inúmeros osteócitos e ausência de linhas de reversão, aparentando maior maturidade. A(X5); B(X10); C(X20); D(X5); E(X10); F(X20); HE.

Discussão

O Piascledine[®] 300 tem sido utilizado no tratamento de artrite, onde estudos relataram que este medicamento diminui significativamente o curso da doença, protegendo o tecido ósseo e cartilaginoso dos processos degenerativos que ocorrem nas articulações^{20,7}. Estas condições ocorrem devido ao bloqueio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , iNOS⁴ e estímulo da secreção de fatores de crescimento como o TGF- β 1, TGF- β 2 e BMPs^{3,8}. Devido a esse mecanismo de ação protetor dos tecidos conjuntivos, podemos supor que esse medicamento influencie no processo de osseointegração, uma vez que este representa uma reação imuno-inflamatória com objetivo de se alcançar a cicatrização do tecido ósseo ao redor de um biomaterial metálico biocompatível^{2,6}.

Para avaliar essa hipótese foram realizadas análises radiográficas, biomecânicas, histomorfométricas e histológicas. Quanto aos resultados da análise radiográfica, as imagens iniciais, o grupo II apresentou menores valores de densidade tanto nas regiões de osso cortical como medular comparado aos grupos I e III. Os animais do grupo II foram submetidos a ingestão do medicamento 7 dias antes do procedimento cirúrgico, e nesse momento de avaliação, era o único grupo de animais sobre o efeito do mesmo. A menor densidade óssea no grupo II no período inicial pode ser explicada pelo fato do medicamento estimular a expressão de TGF- β 1³, e este aumento na expressão de TGF- β 1 diminui a diferenciação osteogênica²⁶. Porém esse efeito na densidade radiográfica demonstrou ser transitório em nosso estudo, pois decorrido o período de osseointegração (60 dias) as densidades radiográficas de todos os grupos foram semelhantes. É provável que o estímulo de fatores de crescimento específicos para o tecido ósseo, como a BMP2^{3,25}, tenham revertido o processo de baixa densidade óssea inicial do grupo II.

Os resultados da análise biomecânica não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Esta ausência de valores estatisticamente significantes pode ser justificada pelo encerramento do processo de maturação do tecido ósseo ao redor do implante após 60 dias de avaliação^{22,41}. Estudos que avaliaram a influência de diferentes tipos de superfícies de implantes tem demonstrado que o resultado final de todas as superfícies é semelhante²³, porém o processo de osseointegração ocorre de forma mais rápida em superfícies modificadas devido a maior adesão de células mesenquimais indiferenciadas e de fatores de crescimento que estimulam a rápida osteogênese, sendo que as diferenças no torque de remoção ocorrem em períodos precoces da cicatrização^{12,45,36}. Estudos que avaliaram o efeito de medicamentos como a ciclosporina²² verificaram um menor torque de remoção nos grupos que tomaram esses medicamentos em relação ao grupo controle. As diferenças nos período de avaliação (dias), de modelos experimentais (coelhos) e do efeito direto do medicamento (ciclosporina) explicam a diferença entre os estudos. Os animais que tomaram ciclosporina ficaram imunossuprimidos, com menor peso corporal em relação ao grupo controle¹⁶, fato esse que não foi encontrado em nosso estudo.

Outro medicamento que interfere na osseointegração de implantes é o alendronato. Estudos em ratas osteoporóticas demonstraram um torque de remoção superior em animais que faziam uso de alendronato³⁵ em comparação a ratas controle com osteoporose. De maneira semelhante, acreditamos que o efeito do ASU possa ser mais evidente em grupos especiais de indivíduos com deficiências no metabolismo ósseo, como os que sofrem de osteoporose. Como aparentemente o efeito dos ASU no metabolismo ósseo é sutil, as diferenças estatisticamente significativas são mais difíceis de serem observadas na avaliação de torque de remoção, que avalia apenas a estabilidade primária do implante ao osso

do hospedeiro, constituindo um teste mecânico inadequado para avaliar pequenas diferenças biológicas.

Na análise histomorfométrica, foi observada a área óssea entre as espiras dos implantes e o contato osso-implante, nas regiões do osso cortical e medular. Os resultados da avaliação do contato osso-implante na região cortical demonstraram haver diferença estatisticamente significativa nos grupos II e III, em relação ao grupo controle. Todos os demais resultados não apresentaram qualquer diferença estatística entre os grupos. Os resultados da análise histomorfométrica podem ser parcialmente explicados pelas reações biológicas verificadas na análise histológica onde os animais do grupo II e do grupo III apresentaram um padrão de cicatrização óssea mais maduro que os animais do grupo I, o que determinou o maior grau de osseointegração nos grupos que tomaram o ASU.

Adicionalmente, é provável que o estímulo dos fatores de crescimento e o bloqueio das citocinas inflamatórias tenham acelerado o processo de remodelação óssea^{3,4,18}, com diminuição da reabsorção óssea induzida pela necrose após a instalação do implante, permitindo uma formação óssea mais rápida nos grupos ASU devido também a menor quantidade de volume ósseo necessário para a osseointegração. Um estudo que avaliou o efeito da ciclosporina na osseointegração demonstrou um menor contato osso-implante na região cortical em animais que fizeram uso desse medicamento⁴⁰. A ciclosporina é um imunossupressor que assim como o ASU inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que também beneficiam o processo de cicatrização²¹, porém os ASU compensam os efeitos anti-inflamatórios com a secreção de fatores de crescimento do tecido conjuntivo³. Os alendronatos tem demonstrado um efeito benéfico na osseointegração em animais osteoporóticos em curtos períodos de avaliação, porém períodos prologados de uso desse medicamento ou a aplicação do mesmo em animais sem osteoporose tem demonstrado efeitos

negativos a osseointegração⁴⁴. As diferenças encontradas em relação aos bifosfonatos e o ASU também se devem a diferenças no mecanismo de ação destes medicamentos, pois os bifosfonatos bloqueiam todo tipo de metabolismo ósseo seja ele catabólico ou anabólico³² enquanto que os ASU estimula a formação óssea³.

Podemos considerar satisfatórios os achados deste estudo, em função de ser um trabalho inicial e haver poucas publicações a respeito do fármaco. Porém algumas questões como a influência em curto prazo do ASU na osseointegração, e a influência em grupos especiais de indivíduos com distúrbios no metabolismo ósseo (exemplos: Osteoporose, Diabetes, Artrite) necessitam ser esclarecidos, assim como o período ótimo para a aplicação desse medicamento com o intuito de promover uma melhor osseointegração dos implantes dentários. Adicionalmente, os resultados do presente estudo não podem ser extrapolados para os seres humanos.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e com a metodologia aplicada pode-se concluir que o ASU interfere positivamente na osseointegração de implantes dentários, porém essa interferência demonstrou ser sutil e foi comprovada apenas pelos testes histológicos e histométricos, sendo necessária a avaliação imuno-inflamatória para melhor compreensão biológica dos benefícios promovidos pela administração do ASU.

Referências

1. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990; 5: 347-59.
2. Albrektsson T, Lekholm U. Osseointegration: current state of the art. *Dent Clin North Am*. 1989; 33: 537-54.
3. Andriamanalijaona R, Benateau H, Barre PE, Boumediene K, Labbe D, Compere JF, et al. Effect of interleukin-1beta on transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 expression in human periodontal ligament and alveolar bone cells in culture: modulation by avocado and soybean unsaponifiables. *J Periodontol*. 2006; 77: 1156-66.
4. Au RY, Al-Talib TK, Au AY, Phan PV, Frondoza CG. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL- β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E₂ and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthr Cartil*. 2007; 15: 1249-55.
5. Bain C. Smoking and implant failure – benefits of a smoking cessation protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11: 756-9.
6. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 197-212.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C, et al. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Rheum.* 2009; 11:R41.
8. Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guilou GB, Pujol JP. Avocado/soybean unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 148-56.
9. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hasson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prosthesis; Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969; 3: 81-100.
10. Clokie CM, Warshawsky H. Development of a rat tibia model for morphological studies of the interface between bone and a titanium implant. *Compendium.* 1995; 16: 56-68.
11. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues; the Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; 11: 318-26.
12. Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Behav Mech Mater Biomed.* 2008; 1: 234-42.
13. Fu E, Hsieh Y-D, Nieh S, Wiskesjö LD. Effects of cyclosporine A on alveolar bone: an experimental study in the rat. *J Periodontol.* 1999; 70: 189-94.
14. Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22: 259-64.

15. Granström G. The use of hyperbaric oxygen to prevent implant loss in the irradiated patient. In: Worthington P, Bränemark P-I, eds. *Advanced osseointegration surgery. Applications in the maxillofacial region*. Illinois: Quintessence; 1992. p. 336-45.
16. Gratwohl A, Riederer I, Graf E, Speck B. Cyclosporin toxicity in rabbits. *Lab Anim*. 1986; 20: 213-20.
17. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis-impact on periodontal pathology. *J Dent Res*. 2006; 85: 15-21.
18. Heinecke LF, Grzanna MW, Au AY, Mochal CA, Rashmir-Raven A, Frondoza CG. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthr Cartil*. 2010; 18: 220-7.
19. Henrotin YE, Labasse AH, Jaspar JM, De Groote DD, Zheng SX, Guillou GB, et al. Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes. *Clin Rheumatol*. 1998; 17: 31-9.
20. Henrotin YE, Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Guillou GB, Msika P, et al. Avocado/Soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol*. 2003; 30: 1825–34.
21. Ivanoff C-J, Sennerby L, Lekholm U. Influence of mono and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 25: 229-35.

22. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987; 2: 69-75.
23. Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13: 315-21.
24. Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil AL, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, et al. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP- 1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol*. 2001; 72: 1685-94.
25. Levi B, Nelson ER, Li S, James AW, Hyun JS, Montoro DT, et al. Dura mater stimulates human adipose-derived stromal cells to undergo bone formation in mouse calvarial defects. *Stem Cells*. 2011; 29: 1241-55.
26. Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor1 (TGF-1) signaling. *J Biol Chem*. 2011; 286: 39497–509.
27. Licata AA. Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates. *Ann Pharmacother*. 2005; 39: 668-77.
28. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratamento de periodontia clínica e implantodontia oral. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
29. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. The association between mandibular alveolar bone resorption around osseointegration dental implants and cigarette smoking. *Clin Oral Implants Res*. 1996; 7: 329-36.

30. Lippiello L, Joseph V, Nardo JV, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of avocado/soy unsaponifiables on articular chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008; 5: 191-7.
31. Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (Piasclédine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1991; 58: 241-5.
32. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136: 1658-68.
33. Misch CE, Hoar JB, Beck G, Hazen R. A bone quality based implant system: a preliminary report of stage I and stage II. *Implant Dent.* 1998; 7: 35-42.
34. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20: 569-77.
35. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18: 218–23.
36. Omar OM, Lennerås ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, et al. The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials.* 2011; 32: 374 – 86.
37. Pavelka K. ASU (piascledine) in treatment of osteoarthritis - New findings about possible effects on structural progression. *Rheumatologia.* 2011; 25: 33-7.
38. Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea.* 4^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier ; 2005.

39. Sakakura CE, Marcantonio EJr, Wenzel A, Scaf G. Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 34-9.
40. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti FH Jr., Alba RC Jr., Marcantonio E Jr. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: A histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol.* 2003; 74: 976-81.
41. Schierano G, Canuto RA, Navone R, Peirone B, Martinasso G, Pagano M, et al. Biological factors involved in the osseointegration of oral titanium implants with different surfaces: a pilot study in minipigs. *J Periodontol.* 2005; 76: 1710-20.
42. Sennerby L, Rasmusson L. Osseointegration surgery: host determinants and outcome criteria. In: Zarb G, Lekholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H, editors. *Aging, osteoporosis and dental implants.* Chicago: Quintessence; 2001. p. 55-66.
43. Spin-Neto R, Belluci MM, Sakakura CE, Scaf G, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Homeopathic symphytum officinale increases removal torque and radiographic bone density around titanium implants in rats. *Homeopathy.* 2010; 99: 249-54.
44. Starck WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10: 74-8.
45. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 172-84.
46. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials.* 1996; 17: 15-22.
47. Yaman M, Eser O, Cosar M, Bas O, Sahin O, Mollaoglu H, et al. Oral administration of avocado soybean unsaponifiables (ASU) reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Arch Med Res.* 2007; 38: 489-94.

Anexos

ANEXO 1 - Bula do medicamento.

Piascledine 300 – Bula do medicamento Piascledine 300

Princípios ativos: **Extrato Insaponificável de Abacate e Soja, Glycine Max e Persea Gratissima.**

Uso adulto.

- Indicações de Piascledine 300

PIASCLEDINE® 300 é indicado:

No tratamento dos quadros dolorosos de artrose de quadril e joelho;

Como coadjuvante do tratamento das periodontites e gengivites.

- Efeitos Colaterais de Piascledine 300

Podem ocorrer, raramente, eructações com odor lipídico que podem ser evitadas com a ingestão da cápsula durante a refeição.

- Como Usar (Posologia)

1 cápsula de PIASCLEDINE® 300 ao dia, junto à refeição. A cápsula deve ser ingerida inteira, com um copo cheio de água. Não mastigue nem abra a cápsula.

O tratamento deve perdurar por 3 a 6 meses nos casos de osteoartroses e por 1 a 3 meses nos casos de periodontopatias.

- Contra-Indicações de Piascledine 300

Nos casos de hipersensibilidade aos constituintes do produto.

- Modo de Uso (Posologia) de Piascledine 300

1 cápsula de PIASCLEDINE® 300 ao dia, junto à refeição. A cápsula deve ser ingerida inteira, com um copo cheio de água. Não mastigue nem abra a cápsula.

O tratamento deve perdurar por 3 a 6 meses nos casos de osteoartroses e por 1 a 3 meses nos casos de periodontopatias.

- Composição

Cada cápsula contém:

Extrato de óleo insaponificável de abacate e soja 300,0 mg

(Insaponificável de abacate 100,0 mg; Insaponificável de soja 200,0 mg)

Excipientes: hidroxitolueno butilado, dióxido de silício coloidal, q.s.p. 1 cápsula

- Conduta na Superdosagem

Não há dados disponíveis sobre a administração de sobredose do produto. Nesses casos podem ocorrer náuseas e o paciente deve ser monitorado quanto às reações gastrintestinais.

Forma Farmacêutica e Apresentação

Cápsulas – caixa com 15 cápsulas.

- Informações Técnicas

CARACTERÍSTICAS

NOMENCLATURA OFICIAL

Abacate

Gênero: Persea

Espécie: gratissima

Variedades utilizadas: Fuerte e Hass

Autor do binômio: Gaemt

Família: Lauraceae

Soja

Gênero: Glycine

Espécie: max

Variedades utilizadas: Altona e Swift

Autor do binômio: (L.) Merrill

Família: Leguminosae (Fabaceae)

PIASCLEDINE® 300 é um composto de óleos insaponificáveis de abacate (*Persea gratissima*) e de soja (*Glycine max*), extraídos do fruto e das sementes dessas plantas, respectivamente, através do processamento dessas partes. Essa mistura consiste ainda em constituintes não glicéricos, como triterpenos e álcoois alifáticos, carotenóides, fitosteróis e tocoferóis.

Esses insaponificáveis comprovaram ser eficientes em osteoartroses dolorosas, nas quais diminuíram o curso da doença.

Osteoartrose – PIASCLEDINE® 300 pertence ao grupo das Drogas Sintomáticas de Ação Lenta para o Tratamento das Osteoartroses (Symptomatic Slow-Acting Drugs for Treatment of Osteoarthritis – SYSADOA).

O tratamento das osteoartroses busca diminuir o processo de destruição articular e, particularmente, da degradação da cartilagem. O efeito benéfico de PIASCLEDINE® 300 sobre a cartilagem, demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*, deve-se a sua ação condroprotetora e condroestimulante.

In vitro, PIASCLEDINE® 300 inibe a degradação dos proteoglicanos no tratamento agudo. O estímulo da síntese e da secreção de proteoglicanos pelos condrócitos osteoartrósicos foi observado em tratamentos a longo prazo. Após a administração de dose única das frações isoladas, o óleo insaponificado de soja mostrou ter ação preponderante. Entretanto, quando administrado em doses repetidas, o óleo insaponificado de abacate demonstrou um efeito maior sobre a síntese de proteoglicanos. A combinação dos dois compostos permite a ação complementar entre ambos.

PIASCLEDINE® 300 conduz a um aumento de 20% a 80% na síntese de colágeno pelos sinoviócitos e pelos condrócitos articulares, respectivamente. Ao mesmo tempo, PIASCLEDINE® 300 diminui em cerca de 50% a atividade da colagenase, enzima degradativa da cartilagem. Além disso, o produto interfere no efeito deletério da interleucina-1 nos condrócitos. A interleucina-1 exerce um importante papel na destruição da cartilagem articular. A atividade colagenolítica dessa citocina é reduzida pelo PIASCLEDINE® 300 e, portanto, ao impedir o efeito da interleucina-1, PIASCLEDINE® 300 permite a restauração da produção normal de colágeno e da malha de tecido conjuntivo.

O tratamento deve ter a duração de 3 a 6 meses e o seu efeito persiste por até 2 meses após o tratamento.

Informações ao Paciente

Ação esperada do medicamento: PIASCLEDINE® 300 estimula a recuperação dos tecidos conjuntivos e sua ação é mais efetiva nos casos de dores provocadas por artrose.

Cuidados de armazenamento: as cápsulas de PIASCLEDINE® 300 devem ser mantidas na embalagem original, à temperatura ambiente (15°C a 30°C), em local seco e protegido da luz.

Prazo de validade: não utilize medicamento com a validade vencida. Observe o prazo de validade impresso na embalagem. PIASCLEDINE® 300 tem validade de 36 meses a partir da data de fabricação.

Gravidez e lactação: informe seu médico sobre a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término. Informar ao médico se está amamentando. Não se recomenda o uso de PIASCLEDINE® 300 durante a gravidez ou a amamentação.

Cuidados de administração: siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento. Tome sempre a cápsula de PIASCLEDINE® 300 com um copo de água e junto com uma refeição. Não mastigue nem abra a cápsula.

Interrupção do tratamento: não interromper o tratamento sem o conhecimento de seu médico.

O tratamento pode perdurar por até 6 meses e deve ser seguido conforme as instruções de seu médico.

Reações adversas: informe seu médico sobre o aparecimento de reações desagradáveis.

Raramente, você poderá sofrer eructações com odor de óleo, o que pode ser evitado tomando sempre a cápsula junto com uma refeição.

“TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS”.

Ingestão concomitante com outras substâncias: não há dados sobre a interação do produto com outras drogas; portanto, durante o tratamento com PIASCLEDINE® 300, tome somente os medicamentos prescritos por seu médico.

Contra-indicações e precauções: informe seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início ou durante o tratamento. Não deve ser usado durante a gravidez e a lactação.

PIASCLEDINE® 300 é contra-indicado nos casos de hipersensibilidade conhecida a qualquer componente da fórmula.

Durante o tratamento, visite regularmente seu médico e realize os exames complementares solicitados.

“NÃO TOME REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO, PODE SER PERIGOSO PARA A SUA SAÚDE”.

Interações Medicamentosas

Não há dados sobre a interação do produto com outras drogas.

Pacientes Idosos

Deve-se manter os mesmos cuidados recomendados para pacientes adultos.

“ATENÇÃO: ESTE PRODUTO É UM NOVO MEDICAMENTO E EMBORA AS PESQUISAS REALIZADAS TENHAM INDICADO EFICÁCIA E SEGURANÇA QUANDO CORRETAMENTE INDICADO, PODEM OCORRER REAÇÕES ADVERSAS IMPREVISÍVEIS AINDA NÃO DESCRITAS OU CONHECIDAS. EM CASO DE

SUSPEITA DE REAÇÃO ADVERSA O MÉDICO RESPONSÁVEL DEVE SER NOTIFICADO”.

Reg. MS-1.0082.0144

Farm. Resp.: Dr. José de Andrade – CRF-SP nº 6369

“VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA”.

SOLVAY FARMA LTDA: Administração: Rua Sergipe,120 – CEP 01243-000 – São Paulo – SP – Brasil

Fone: (0xx11) 3257-9844 – Fax: (0xx11) 3257-6914 / 3259-7922 / 3259-7944 / 3231-3847

Matriz e Fábrica: Rua Salvador Branco de Andrade, 93 – CEP 06760-100 – Taboão da Serra – SP – Brasil

Fone: (0xx11) 4787-3100 – Fax: (0xx11) 4787-3191

Nº de lote, data de fabricação e de validade: vide cartucho e/ou rótulo.

Fabricado por: Laboratoires EXPANSCIENCE – FRANÇA

Embalado e distribuído por:

SOLVAY FARMA LTDA.

Rua Salvador Branco de Andrade, 93, Taboão da Serra – SP – Indústria Brasileira

CNPJ: 60.499.639/0001-95

SAC: 0800-141500

Precauções e Advertências

Gravidez e amamentação

Não existem estudos disponíveis sobre o uso de PIASCLEDINE® 300 em mulheres grávidas.

Portanto, não se recomenda a sua utilização durante a gravidez e a amamentação.

Pediatria

Não se recomenda o uso em crianças, pois não há estudos em pediatria.

Laboratório

Solvay Farma Ltda.

ANEXO 2 - Comitê de Ética.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 17/2009

Araraquara, 17 de novembro de 2009

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 16/10/2009, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na doença periodontal induzida e na osseointegração. Avaliação histológica, radiográfica e imunoinflamatória em ratos" (Proc. CEEA nº 17/2009) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para DEZEMBRO/2012.

Atenciosamente.


Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

À
Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-003 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5ª andar - fone (16) 3301-6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: detac@foc.unesp.br - home page: <http://www.foc.unesp.br>

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2012.

Luiz Guilherme Freitas de Paula