



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luiz Guilherme Freitas de Paula

***AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO EXTRATO DE
ÓLEO INSAPONIFICÁVEL DE ABACATE E
SOJA NA OSSEOINTEGRAÇÃO EM RATOS
COM ARTRITE INDUZIDA***

ARARAQUARA

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luiz Guilherme Freitas de Paula

***AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO
EXTRATO DE ÓLEO INSAPONIFICÁVEL
DE ABACATE E SOJA NA
OSSEOINTEGRAÇÃO EM RATOS COM
ARTRITE INDUZIDA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia – Área de Implantodontia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista para o título de
Doutor em Odontologia

Orientador: Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

ARARAQUARA

2016

Paula, Luiz Guilherme Freitas de

Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração em ratos com artrite induzida / Luiz Guilherme Freitas de Paula -- Araraquara : [s.n.], 2016.

88 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

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

Luiz Guilherme Freitas de Paula

Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de
abacate e soja na osseointegração em ratos com artrite induzida

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

4º Examinador: Prof. Dr. Celso Eduardo Sakakura

5º Examinador: Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz

Araraquara, 16 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

Luiz Guilherme Freitas de Paula

Nascimento: 22/12/1984 – São José do Rio Preto - SP

Filiação: Luiz Carlos Freitas de Paula e Vera Lúcia Freitas de Paula

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

2010-2012 Pós-graduação em Odontologia – Nível Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2012-2016 Pós-graduação em Odontologia – Nível Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Agradecimentos

Aos meus pais, por serem as pessoas mais importantes de minha vida, meu porto seguro, pelo amor incondicional, e por todas as vezes que abriram mão de suas vontades para realizarem os meus sonhos. Esta conquista de hoje também é de vocês.

À Lívia Jacovassi Tavares, por estar ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades, pelo amor e incentivo pelo meu sucesso. Obrigado por fazer meus dias mais alegres.

À minha irmã, tios, tias e primos; agradeço a torcida e as orações que ajudaram a me manter sereno ao longo desta caminhada.

À Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, pela disposição e paciência com que orientou meus passos na vida acadêmica; pelos conselhos e imenso carinho durante todos esses anos. Espero não ter decepcionado suas expectativas e ter sido merecedor de sua confiança.

Ao Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, por ter me apresentado à Periodontia, por compartilhar seus conhecimentos profissionais, pela oportunidade e confiança depositada em meu trabalho.

Ao grande mestre Prof. Dr. Élcio Marcantonio, por abrir as portas do seu local de trabalho para que eu aprendesse as diversas técnicas cirúrgicas com todo seu talento e perfeição. O Senhor é um exemplo de dedicação, competência, humildade e superação. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, pelos bons momentos de convivência; pela colaboração nas horas decisivas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Marcantonio e Prof. Dr. Rodolfo Jorge Boeck Neto, pelos ensinamentos profissionais e de vida; por todo o carinho e bons momentos de convivência.

Às amigas construídas nestes 8 anos de FOAr: Andrés, Rubão, Faeda, Wagner, Humberto, Chaine, Gui, Andressa, Marina, Sabrina, Shellon, Mateus, Rubinho, JP, Molon, Érica, Pedrão, João, Lucão, Nicolau, Jonatas, Verzola, Luana, Frizzera, Tonetto, Pablito, Elton, Piauí, Marcel, Giovana, Fernanda, Suzane, Livia, Brunão, Nader, Maurício, Rafinha, Kahena, Lemão, Lelis e Xuxa.

Aos professores Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza e Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos, que contribuíram no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Sabrina Garcia de Aquino, colaboração na metodologia de indução de atrite.

Aos alunos de iniciação científica Felipe Eduardo Pinotti e Bruna Biagioni Grecchi, pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos funcionários do departamento Isa, Leandro, Cláudia e Suleima pelo convívio tão agradável e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação Alexandre e Cristiano pela atenção e disponibilidade com que me atenderam por tantas vezes que precisei.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa de sua Diretora Prof.^a Dr.^a Andréia Affonso Barretto Montandon e sua Vice-Diretora Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato, pelas condições para realização desta pesquisa.

Ao Coordenador e o vice coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior e Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli pela dedicação, competência e esforço empreendidos na realização deste curso.

Aos docentes da disciplina de Periodontia: Silvana Regina Perez Orrico, José Eduardo Cezar Sampaio, Adriana Marcantonio, Élcio Marcantonio Júnior, Carlos Rossa Júnior, Joni Augusto Cirelli, Daniela Leal Zandim-Barcelos pelos conhecimentos transmitidos durante o curso de mestrado e doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Neodent - por fornecer os implantes para a realização deste trabalho.

De Paula LGF. Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na osseointegração em ratos com artrite induzida [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

Resumo

Este estudo avaliou a influência da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (ASU) na osseointegração de implantes em animais saudáveis e com artrite. Foram utilizados implantes de titânio com 4 mm de comprimento x 2.2 mm de diâmetro, instalados nas tíbias dos ratos. No estudo 1, trinta ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: ASU1: administração de ASU a partir de 7 dias antes da colocação do implante; ASU2: administração de ASU começando no dia da colocação do implante, e CTL: administração de solução salina. Em todos os animais, um implante de titânio foi colocado em cada uma das tíbias. Todos os animais receberam ASU ou solução salina por sonda gástrica diariamente durante 60 dias até o sacrifício. Osseointegração foi avaliada por análise de densidade óssea radiográfica; biomecânica; histologia descritiva; imuno-histoquímica para BMP-2, TGF- β 1, e osteocalcina; e avaliação histomorfométrica de contato osso-implante (BIC) e fração de área mineralizada do osso dentro das roscas do implante (BAFO). ASU1 e ASU2 apresentaram maior expressão de BMP-2 e TGF- β 1 em comparação com CTL ($P < 0,05$). Na análise histomorfométrica, os grupos ASU1 e ASU2 apresentaram valores significativamente mais elevados BIC somente na região de osso cortical, quando comparado com o CTL ($P < 0,05$). No estudo 2, 120 animais foram divididos randomicamente em quatro grupos: CTR- Animais saudáveis que ingeriram soro; ASU- Animais saudáveis que ingeriram ASU; ART- Animais com artrite que ingeriram soro; ART/ASU- Animais com artrite que ingeriram ASU. As soluções foram administradas diariamente, por gavagem, iniciando-se 7 dias antes do procedimento cirúrgico até a

conclusão do período experimental (15, 30 e 60 dias após a instalação dos implantes). Foram realizados a análise microtomográfica (avaliação da porcentagem de osso ao redor do implante); análise biomecânica (torque de remoção); e análise histométrica (contato osso implante-%BIC; área de osso entre as roscas-%BAFO), análise imuno-histoquímica e descrição histológica. Nos resultados de microtomografia o grupo ART/ASU apresentou menor densidade de osso na área próxima ao implante que os grupos ASU e ART (15 e 60 dias). Na análise biomecânica a força de contra-torque para remoção dos implantes foi maior no grupo ART/ASU no período de 30 dias. Na histometria foi verificado que o grupo ASU e ART/ASU apresentaram maiores valores de %BIC que o grupo ART no período de 60 dias; o grupo ASU apresentou maior %BIC que o grupo CTR aos 60 dias; e o grupo ART/ASU apresentou maior %BIC que o grupo ART aos 30 dias. A %BAFO foi maior nos animais do grupo ART/ASU em relação aos do grupo ART nos períodos de 30 e 60 dias. Na histologia foi verificado no grupo ASU um tecido ósseo maduro em relação ao grupo CTR; e o grupo ART foi observado um processo de remodelação óssea lento. Na imuno-histoquímica foi verificado uma maior expressão de osteocalcina no grupo CTR e de TGF- β 1 no grupo ASU. O extrato de óleo insaponificável de abacate e soja teve uma influência positiva na osseointegração dos implantes.

Palavras chave: Fitoterapia. Remodelação óssea. Osseointegração. Implantes dentários.

Paula LGF. Effectiveness evaluation of unsaponifiable oil extract of avocado and soy in osseointegration in rats with induced arthritis trial [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia; 2016.

Abstract

This study evaluated the influence of the administration of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on implant osseointegration in healthy and arthritis animals. Titanium implants were used with 4 mm length x 2.2 mm diameter, installed in the tibiae of rats. In study 1, thirty rats were randomly divided into three groups: ASU1: ASU administration from 7 days prior to implant placement; ASU2: ASU administration beginning on the day of implant placement, and CTL: saline solution administration. In all animals a titanium implant was placed in each of the tibia. All animals received ASU or saline by gavage every day for 60 days until the sacrifice. Osseointegration was evaluated by analysis of radiographic and biomechanical bone density; descriptive histology, immunohistochemistry for BMP2, TGF β 1, and osteocalcin, and histomorphometric evaluation ossoimplante contact (BIC) and mineralized area fraction of the bone into the threads of the implant (BBT). ASU1 ASU2 and showed increased expression of TGF- β 1 and BMP-2 compared to CTL (P <0.05). The histomorphometric analysis, ASU1 and ASU2 groups showed significantly higher values BIC only in the cortical bone region, as compared to the CTL (P <0.05). In study 2, 120 animals were randomly divided into four groups: CTR- Healthy animals who consumed saline solution; ASU- Healthy animals that consumed ASU; ART- Animals with arthritis who consumed saline solution; ART/ASU- Animals with arthritis who consumed ASU. The solutions were administered daily by gavage, starting seven days before surgery until completion of the trial period (15, 30 and 60 days after implant placement). It was carried out microtomography analysis (percentage of bone around

the implant); biomechanical analysis (removal torque); and histometric analysis (bone-to-implant contact -%BIC; bone area -%BBT), immunohistochemistry and descriptive histology. The results of microtomography ART/ASU group showed lower % of bone in the area around the implant that ASU and ART groups (15 and 30 days). In biomechanical analysis, force counter-torque for implant removal was higher in the ART / ASU group within 30 days. In histometry it was found that the ASU group and ART / ASU had higher %BIC values that the ART group within 60 days; ASU group had higher %BIC that CTR group at 60 days; and the ART / ASU group had higher %BIC that the ART group at 30 days. The %BBT was higher in animals ART / ASU group in relation to the ART group in periods of 30 and 60 days. In histology was found in the ASU group a mature bone tissue in relation to the CTR group; and the ART group was observed a slow bone remodeling process. In immunohistochemistry it was found a higher osteocalcin expression in the CTR group and TGF- β 1 in the ASU group. The unsaponifiable oil extract of avocado and soy had a positive influence on osseointegration of implants.

Key words: Phytotherapy. Bone remodeling. Osseointegration. Dental implants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	19
3.1 PUBLICAÇÃO 1	20
3.2 PUBLICAÇÃO 2	21
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
5 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE 1	60
APÊNDICE 2	70
ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o aparecimento da osseointegração, que estabeleceu a união entre osso e superfície de titânio com os estudos de Bränemark (Bränemark et al.¹², 1969), a utilização de implantes dentais osseointegráveis tem sido amplamente estudada. O conhecimento dos fenômenos biomecânico, o desenvolvimento de novas técnicas e biomateriais tem levado cada vez mais ao sucesso na substituição dos dentes por implantes osseointegráveis (Berglundh et al.⁸, 2002, Passoni et al.³³, 2016).

Estes resultados têm possibilitado a reabilitação protética, criando alternativas para pacientes edentulos totais, parciais e unitários, restabelecendo condições estética, fonética e função (Albrektsson, Lekholm², 1989; Adell¹, 1990).

Embora a alta porcentagem de sucesso quando da utilização desta técnica, condições anatômicas ósseas inadequadas (Misch et al.²⁹, 1998), a topografia e a superfície dos implantes de titânio (Wennerberg et al.³⁸, 1996; Lindhe et al.²⁴, 2005), técnicas cirúrgicas e problemas sistêmicos são considerados fatores de risco para instalação de implantes osseointegrados (Mombelli, Cionca³⁰, 2006; Krennmair et al.²², 2010).

Dentre os fatores sistêmicos destaca-se a artrite reumatoide, que é uma patologia sistêmica, de caráter autoimune e inflamatória crônica, que induz a destruição progressiva e a alteração do metabolismo do tecido ósseo e cartilaginoso presente nas articulações sinoviais (Isaacs²¹, 2010). Acredita-se que sua etiologia seja multifatorial, associando fatores genéticos e ambientais que levam a uma resposta imune alterada (McInnes, Schett²⁸, 2007). As células da cavidade articular (monócitos, neutrófilos e células T) promovem liberação de diversos mediadores inflamatórios a partir da

interação com células residentes e matriz, com subsequente dano tecidual (Barsante et al.⁶, 2008; Zhang et al.⁴⁰, 2011). Essa doença tem incidência de 1 a 2% da população mundial, causando limitações de movimento e dores que afetam a qualidade de vida de seus portadores (Berthelot, Le Goff.⁷, 2010) e patologias que afetam o tecido ósseo como a osteoporose (Lane et al.²³, 1998; Westhovens, Dequeker³⁷, 2000; Haugeberg et al.¹⁶, 2000).

O número de pessoas diagnosticadas com artrite reumatoide que necessitam de tratamento com implantes osseointegrados cresce proporcionalmente à expectativa de vida (Helmick et al.¹⁸, 2008). Sendo o processo de osseointegração dependente da qualidade do metabolismo ósseo do hospedeiro, autores levantam a hipótese que pacientes com artrite reumatoide apresentariam padrões inferiores de osseointegração (Yokokoji et al.³⁹, 2009; Krennmair et al.²², 2010). Em função deste déficit ósseo, a utilização de medicamentos que visem a melhora do quadro clínico da artrite reumatoide e que também possam modular positivamente o processo de osseointegração tem sido estudado (Oliveira et al.³¹, 2014).

Alguns estudos in vivo avaliaram a osseointegração de implantes de titânio em um modelo experimental de artrite induzida por antígeno (Sennerby, Thomsen³⁶, 1993; Bränemark, Thomsen¹³, 1997). Na avaliação de contato osso-implante, os implantes instalados nos espécimes artríticos tiveram um menor grau de contato osso-implante em relação aos que foram inseridos em animais saudáveis (Sennerby, Thomsen³⁶, 1993). Entretanto, na avaliação de fixação mecânica não encontrou diferença estatística significativa quando comparados ao controle saudável (Bränemark, Thomsen¹³, 1997).

O extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (ASU) é um composto 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 (vide bula, Anexo A). Esse medicamento demonstrou reduzir o quadro doloroso que ocorrem na artrite (Christensen et al.¹⁵, 2008; Cameron et al.¹⁴, 2001) levando a melhora na dinâmica de movimentação das articulações (Appelboom et al.⁴, 2001; Maheu et al.²⁶, 2014). Ele age na diminuição em cerca de 50% a atividade da colagenase, 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 (Mauviel et al.²⁷, 1991). Alguns estudos in vitro, pré-clínicos e clínicos têm descrito resultados da utilização do ASU sobre a artrite reumatóide:

Mauviel et al.²⁷ (1991), estudaram o efeito do ASU sobre a atividade colagenolítica em culturas de sinoviócitos de pacientes com artrite reumatóide e condrócitos articular de coelhos tratados com interleucina-1. Os autores observaram que a incubação dos dois tipos de células com o ASU, quando expostos a interleucina-1 (IL-1) impede parcialmente o efeito desta proteína. Estes dados sugerem um potencial papel do medicamento para limitar os efeitos deletérios da IL-1 em doenças osteoarticulares, reduzindo a capacidade desta citocina de estimular a produção de colagenase pelos sinoviócitos e condrócitos.

Em 1998, Henrotin et al.²⁰, 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 (1 parte de abacate e 2 partes de soja), 2:1 (2 partes de abacate e 1 parte de soja) ou 1:1 (2 partes de abacate e 2 partes de soja). Os condrócitos foram isolados e cultivados na ausência ou presença de interleucina-1 β (IL-1 β), e testados nas diferentes concentrações. Todas as concentrações do ASU reduziram a produção de estromelina, 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.

Andriamanalijaona et al.³ (2006), investigaram o efeito *in vitro* do extrato insaponificável de abacate e soja na expressão do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1), beta 2 (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 periodontal e osso foram incubadas com ASU na presença ou ausência de IL-1 β . O medicamento estimulou a expressão de TGF- β 1, TGF- β 2 e BMP-2, sugerindo que o ASU pode exercer ação preventiva sobre os efeitos deletérios exercidos pela IL-1 β na doença periodontal.

O estudo de Au et al.⁵ (2007), avaliou os efeitos do ASU nos mediadores pró-inflamatórios em condrócitos articulares, monócitos e macrófagos. Os resultados obtidos identificaram que o ASU reduziu a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , ciclo-oxigenase 2 (COX2) e expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em condrócitos ativados por lipopolissacarídeo (LPS). 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.²⁵ (2008). Com o intuito de esclarecer o conteúdo do ASU, amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massa. A avaliação da atividade anti-inflamatória do medicamento foi testada em condrócitos bovinos *in vitro*, através da medida de redução da síntese de IL-1, de prostaglandina 2 (PGE2) induzida e metaloproteases (MMP). O ASU foi efetivo na inibição da IL-1 induzida, na atividade da MMP-3 e síntese da PGE2.

Heinecke et al.¹⁷ (2010), avaliaram o efeito anti-inflamatório do ASU e da epigallocatequina galato (EGCG) na expressão da 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.³² (2011), apresentaram um relatório com dados epidemiológicos sobre o impacto da osteoartrite, evidenciando os efeitos da utilização do ASU. Os resultados demonstraram que o medicamento tem ação anti-inflamatória, inibindo mediadores destrutivos (IL-1 e metaloproteinases) e estimula mediadores anabólicos (TGF-β). Relatou a eficácia e segurança do medicamento sendo recomendado especialmente para osteoartrites dolorosas.

Maheu et al.²⁶ (2013), avaliaram a capacidade do ASU em retardar a progressão da osteoartrite do quadril. Pacientes com sintomas de dor há mais de 1 ano e espaço articular do quadril entre 1 e 4 mm em uma radiografia pélvica foram tratados com ASU ou placebo. Após acompanhamento de 3 anos foi observada redução no percentual de progressão da doença no grupo tratado com o medicamento.

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 com grande número de células inflamatórias, que após alguns dias é substituído por tecido de granulação rico em neutrófilos e macrófagos. Neste tecido de granulação, os macrófagos de reparação e as células mesenquimais indiferenciadas iniciam a produção e liberação de fatores de crescimento, que estimulam a formação de tecido conjuntivo provisório rico em fibroblastos, que posteriormente se diferencia em osteóide (osso primário), terminando com a remodelação óssea onde o osso primário é substituído por osso lamelar (Lindhe et al.²⁴, 2005).

Em virtude do medicamento PIASCLEDINE[®] 300 (ASU) estar indicado no tratamento de osteoartrites, que é uma doença imunoinflamatória induzida por citocinas pró-inflamatórias, estudos na área médica têm 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.

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se a utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja favorece a osseointegração. Para isso este estudo foi subdividido em 2 publicações com os objetivos:

Objetivos Específicos

Publicação 1 - Avaliar as respostas teciduais da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja durante a osseointegração.

Publicação 2 – Avaliar as respostas teciduais da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja durante a osseointegração, em animais com artrite induzida.

3 PUBLICAÇÕES

3. 1 PUBLICAÇÃO 1 - Oliveira GJ, de Paula LG, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Spolidório LC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RA. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Jul-Aug;29(4):949-57. (QUALIS A2)

Effect of Avocado/Soybean Unsaponifiables on Osseointegration: A Proof-of-Principle Preclinical In Vivo Study

Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, DDS, PhD¹/Luiz Guilherme Freitas de Paula, DDS, MS¹/Rubens Spin-Neto, DDS, PhD²/Andreas Stavropoulos, DDS, PhD³/Luis Carlos Spolidório, DDS, PhD⁴/Elcio Marcantonio, Jr, DDS, PhD⁵/Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, DDS, PhD⁵

Purpose: To evaluate the influence of administration of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on implant osseointegration in rat tibiae. **Materials and Methods:** Thirty rats were randomly assigned into one of three equal-sized groups: (1) ASU1: administration of ASU starting 7 days prior to implant placement; (2) ASU2: administration of ASU starting on the day of implant placement, and (3) CTL: administration of saline solution. In all animals, one titanium implant was placed in each tibia. All animals received ASU or saline solution by gavage daily until sacrifice 60 days postoperatively. Implant osseointegration and bone maturation were assessed by biomechanical and radiographic bone density analysis; descriptive histology; immunohistochemistry for bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), and osteocalcin; and histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact (BIC) and mineralized bone area fraction within the threads of the implant. **Results:** ASU1 and ASU2 showed three times higher expression of BMP-2 and nine times higher expression of TGF- β 1 compared with CTL ($P < .05$). Histomorphometric analysis, however, showed that both ASU1 and ASU2 groups presented significantly higher BIC values only in the cortical bone compartment when compared to CTL ($P < .05$). **Conclusion:** ASU consumption seems to exert only a subtle effect on implant osseointegration. *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS* 2014;29:949–957. doi: 10.11607/jomi.3498

Key words: animal study, avocado/soybean unsaponifiables, histomorphometry, implant osseointegration

Although the optimal amount of osseointegration (ie, bone-to-implant contact [BIC]) for the clinical success of oral implants is yet to be determined, much

research effort is directed toward accelerating and/or enhancing BIC. One common approach is by altering the implant itself, which in turn provokes a positive response from the host. Modifications of the implant surface microtopography (ie, increasing implant surface roughness) and/or implant surface chemistry have indeed been shown to enhance osseointegration compared with control implants (eg, machined implants).¹⁻⁵ Similarly, functionalization of the implant by adding bioactive substances to its surface, eg, bisphosphonates^{6,7} and growth factors,⁸ has also been shown to enhance osseointegration.

A less explored approach to accelerate osseointegration is by administration of substances that exert an effect on bone remodeling. For example, systemic administration of simvastatin,⁹ strontium ranelate,¹⁰ or parathyroid hormone¹¹ has been shown to enhance osseointegration. Similarly, the use of "natural" products has also been proposed as an alternative way to improve osseointegration. For example, a recent preclinical in vivo study demonstrated that systemic consumption of comfrey, a common plant, in homeopathic concentrations resulted in increased implant

¹PhD Student, Faculty of Dentistry, Araraquara Dental School, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil.

²PhD Student, Section of Oral Radiology, Department of Dentistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

³Professor in Periodontology, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, Malmö University, Malmö, Sweden.

⁴Professor in Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Araraquara Dental School, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil.

⁵Professor in Periodontology, Faculty of Dentistry, Araraquara Dental School, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil.

G.J.P.L. Oliveira and L.G.F. Paula contributed equally to this article.

Correspondence to: Professor Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Humaitá St, 1680, 14801-130, Araraquara, São Paulo, Brazil. Fax: +55(16) 33016376. Email: adriana@foar.unesp.br

©2014 by Quintessence Publishing Co Inc.

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 949

© 2014 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.

¹De acordo com o apêndice 2, na página 60.

3. 2 PUBLICAÇÃO 2

Artigo Original: Efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate/soja (ASU) sobre a integração de implantes em ratos com artrite experimental.

Luiz Guilherme Freitas de Paula¹; Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira¹; Felipe Eduardo Pinotti¹; Bruna Biagioni Grecchi¹; Sabrina Garcia de Aquino², Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio¹

¹Araraquara Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology, Araraquara, Brazil

²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba - Campus I, Paraíba, Brazil

Autor para Correspondência:

Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Rua Humaitá, 1680. CEP 14801-130, Araraquara, SP.Brasil

Telefone: 55 (16) 33016376 / Fax: 55 (16) 33016369

e-mail: adriana@foar.unesp.br

²De acordo com a revista JOMI, que segue as recomendações do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (Grupo Vancouver). Disponível no site <http://www.icmje.org>.

Resumo

Este estudo avaliou a influência da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (ASU) na osseointegração de implantes em animais com artrite. Foram utilizados 120 ratos que tiveram implantes instalados em suas tíbias (4 mm de comprimento x 2.2 mm de diâmetro). Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos: CTR- Animais saudáveis que consumiram soro; ASU- Animais saudáveis que consumiram ASU; ART- Animais com artrite que consumiram soro; ART/ASU- Animais com artrite que consumiram ASU. As soluções foram administradas diariamente, por gavagem, iniciando-se 7 dias antes do procedimento cirúrgico até a conclusão do período experimental (15, 30 e 60 dias após a instalação dos implantes). Foram realizadas as análises: microtomográfica; biomecânica, histológica/histométrica e imuno-histoquímica. 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%. Nos resultados da microtomografia foi verificado que os grupos ASU e ART apresentaram maior % de osso na região de interesse do que o grupo ART/ASU nos períodos de 15 e 60 dias. Adicionalmente foi verificado que o grupo CTR apresentou maior % de volume ósseo do que o grupo ART/ASU no período de 60 dias ($p < 0.05$). Na análise biomecânica a força de contra-torque para remoção dos implantes foi maior no grupo ART/ASU em comparação aos grupos ASU e ART no período de 30 dias ($p < 0.05$). Adicionalmente foi verificado que com o aumento do período de observação ocorreu um aumento gradual na força de contra-torque de remoção dos implantes em todos os grupos avaliados ($p < 0.01$). Na histometria observou-se que o grupo ASU e ART/ASU apresentaram maiores valores de porcentagem de contato osso-implante (%BIC) que o grupo ART no período de 30 e 60 dias ($p < 0.05$). Também foi verificado que o grupo ASU apresentou

maior %BIC que o grupo CTR aos 60 dias ($p < 0.05$) e o grupo ART/ASU apresentou maior %BIC que o grupo ART aos 30 dias ($p < 0.05$). Adicionalmente, foi verificado um aumento progressivo da %BIC em todos os grupos, entretanto esse aumento foi estatisticamente significativo apenas nos grupos ASU e ART/ASU. Com relação a porcentagem de área óssea entre as espiras do implante (%BAFO) foi verificado que os animais do grupo ART/ASU apresentaram maiores valores de %BAFO que os animais do grupo ART nos períodos de 30 e 60 dias ($p < 0.05$). Assim como nos dados de %BIC, foi verificado um aumento progressivo da %BAFO com o aumento dos períodos experimentais em todos os grupos, entretanto esse aumento foi estatisticamente significativo apenas nos grupos ASU e ART/ASU. Na imuno-histoquímica a expressão das proteínas osteocalcina e TGF- β 1 não foi diferente entre os grupos nos períodos de 15 e 30 dias. Aos 60 dias foi verificado marcação mais forte de osteocalcina no grupo CTR e uma marcação mais evidente de TGF- β 1 no grupo ASU. Nossos resultados indicam que extrato de óleo insaponificável de abacate e soja teve uma influência positiva na osseointegração dos implantes em animais com artrite induzida.

Palavras chaves: fitoterapia, remodelação óssea, artrite adjuvante induzida, implantes dentários.

Introdução

A artrite reumatoide é uma patologia sistêmica de caráter autoimune, inflamatório e crônica que induz a alteração do metabolismo do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo a destruição progressiva desses tecidos dentro das articulações sinoviais (Isaacs, 2010; McInnes et al., 2016). Apesar da incerteza dos eventos que iniciam as reações autoimunes relacionadas a artrite, acredita-se que a sua etiologia seja multifatorial associada a fatores genéticos e ambientais que levam a uma resposta imune alterada (Sparks et al., 2016). As células de defesa da cavidade articular (monócitos, neutrófilos e células T) promovem liberação de diversos mediadores inflamatórios a partir da interação com células residentes e matriz causando o subsequente dano tecidual (Catrina et al., 2016; McInnes et al., 2016). Essa doença tem incidência de 0.5 a 1% da população mundial, promovendo limitações de movimento e dores que afetam a qualidade de vida de seus portadores (Alamanos & Drosos, 2005), e patologias que afetam o tecido ósseo como a osteoporose (McInnes et al., 2016).

O aumento da expectativa de vida da população aumenta a necessidade de instalação de implantes dentários em pacientes sistemicamente comprometidos, inclusive em portadores de artrite reumatóide (Kotsakis et al., 2015). Sendo o processo de osseointegração dependente da qualidade do metabolismo ósseo do hospedeiro, é levantada a hipótese que pacientes com artrite reumatoide apresentam resultados inferiores referentes a utilização de implantes (Krennmair et al., 2010; Diz et al., 2013). Estudos *in vivo* que avaliaram a cicatrização de implantes de titânio em um modelo experimental de artrite induzida por antígeno demonstraram que os implantes instalados nos animais com artrite tiveram um menor grau de osseointegração em relação aos que foram inseridos em animais saudáveis (Sennerby & Thomsen, 1993; An et al., 1998).

Tem sido postulado que o uso de medicamentos utilizados para o tratamento da artrite reumatoide também pode interferir positivamente no processo de osseointegração (Oliveira et al., 2014). O extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (ASU) é um composto extraídos do fruto e das sementes dessas plantas e tem demonstrado reduzir o quadro doloroso que ocorrem na artrite levando a melhora na dinâmica de movimentação das articulações (Appelboom et al., 2001; Maheu et al., 2015; Christiansen et al., 2015). O seu efeito se deve ao bloqueio da expressão de mediadores biológicos pró-inflamatórias (eg.IL-1 β ; TNF- α ; PGE2; iNOS; MMPs) (Kut-Lassere et al., 2001; Au et al., 2007), aumento da expressão de fatores de crescimento (eg.BMP2; TGF β 1) (Andriamanalijaona et al., 2006; Oliveira et al., 2014) e produção de produtos da matriz do tecido conjuntivo (eg.Colágeno; agreccan) (Christiansen et al., 2015). Essa ação tanto de bloqueio da reabsorção, como de estímulo ao reparo de tecidos conjuntivos torna esse medicamento interessante para aplicação em outras condições que teriam seu tratamento beneficiado pelo estímulo da formação do tecido ósseo (Oliveira et al., 2015).

Em um estudo prévio em que foi avaliado a influência da administração do ASU na osseointegração de implantes em tíbias de ratos saudáveis, observou-se que a administração do ASU aumentou o contato osso-implante na região do osso cortical e aumentou a expressão de BMP-2 e TGF- β 1 (Oliveira et al., 2014). Apesar dos sutis efeitos benéficos do ASU na osseointegração, supõe-se que o efeito do ASU teria mais impacto em indivíduos que possuem alguma condição que alterasse o metabolismo do tecido ósseo. Devido a isso, o objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito da administração do ASU sobre a osseointegração de implantes em animais com artrite induzida.

Material e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal (nº09/2012). Neste estudo foram utilizados 120 ratos machos (*Rattus Norvegicus*), variação albinus, Holtzman, pesando de 300 - 330g, que foram alimentados com ração sólida e com acesso a água ad libitum, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com água, luz e temperatura controladas.

Grupos

Os 120 ratos foram divididos em 4 grupos: **GRUPO CTR** - Os animais sem artrite e que foram submetidos ao tratamento com soro fisiológico; **GRUPO ASU** – animais sem artrite em que foi administrado o ASU (Piascledine 300, Expanscience Lab, France), **GRUPO ART** - animais submetidos à indução da artrite em que foi administração do soro fisiológico, **GRUPO ART/ASU** – animais aonde foi induzido a artrite e que foram tratados com ASU. O ASU e o soro fisiológico foram aplicados por gavagem diariamente, sendo que o ASU foi aplicado na dose de 0.6 g/kg/dia (Oliveira et al., 2014; Oliveira et al., 2015). As soluções foram administradas 7 dias antes da colocação dos implantes na região de tíbia até o momento da eutanásia. Cada grupo foi composto de 30 animais que foram subdivididos em 10 animais por período experimental (15, 30 e 60 dias) após a instalação dos implantes.

³De acordo com o apêndice 2, na página 78.

Indução da artrite experimental

Foi utilizado modelo de artrite experimental induzida (AIA) por antígeno e foi realizado em 2 etapas (Pinto et al., 2010): 1) Imunização e 2) Desafio intra-articular. Para realização dos procedimentos de indução da artrite, os animais foram sedados com isoflurano (5% com O₂ para indução e 3% de O₂ para manutenção) (Baxter Helthcare Corporation, Deerfield, IL, USA), utilizando um vaporizador de isoflurano (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA).

A imunização foi realizada através da administração do antígeno albumina de soro bovino metilada (mBSA). Os animais foram sensibilizados com 2 aplicações subcutâneas de 500 µg de mBSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluídos em 0,2 mL de uma solução de emulsão que continha 0.1mL de solução salina e 0,1 mL de solução adjuvante de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA) com intervalo de 7 dias entre as aplicações. Os animais não imunizados receberam injeções de solução salina nos mesmos períodos dos animais imunizados.

Após 7 dias da última aplicação subcutânea do antígeno, a artrite foi induzida através da aplicação intra-articular do antígeno mBSA (10µg/cavidade articular) diluído em 10 µL de PBS na articulação do joelho da pata traseira direita e esquerda. As aplicações foram realizadas com intervalo de 7 dias. Os animais que não receberam o desafio intra-articular receberam injeções de solução salina. O procedimento de instalação dos implantes ocorreu 14 dias após a aplicação do segundo desafio com mBSA e esse desafio foi repetido a cada 14 dias até o momento da eutanásia (Fig.1, Anexo)

A confirmação da indução da artrite foi avaliada por meio de descrição histológica. Para este propósito, as articulações do joelho totais foram isoladas após a

eutanásia dos animais, fixada durante 48 horas em paraformaldeído a 4% e em seguida foram descalcificadas em 10% de solução de EDTA (pH 7,4 em PBS) e embebidos em parafina. Cortes sagitais seriados de 6µm foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E). Essa descrição foi executada por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 mL/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia da região interna das pernas direita e esquerda e foi realizada a antissepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona (PVPI Tópico 10%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Uma incisão de aproximadamente 10 mm realizada em planos, foi realizada sobre a metáfise tibial. Após dissecação, o tecido ósseo foi submetido à osteotomia utilizando uma fresa lança de 2,0 mm (Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil). Todas as perfurações foram realizadas com motor elétrico, ajustado a 1200 rpm, sob abundante irrigação com solução salina estéril. Foi inserido um micro implante por tibia de 2,2 mm de diâmetro por 4 mm de comprimento, que apresentavam superfície usinada de titânio (Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil), instalados com o auxílio de uma chave digital (Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil). O ferimento foi suturado em planos, internamente com fio reabsorvível (Vicryl 5.0, Ethicon, Johnson Prod., São Paulo, SP, Brasil) e

externamente com fio de seda (Seda 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São Paulo, SP, Brasil). Após o procedimento cirúrgico os animais receberam injeção em dose única (0,3 mL/Kg) por via intramuscular de penicilina associada à estreptomicina (Pentabiótico veterinário pequeno porte, Zoetis Dodge, São Paulo, SP, Brasil,), e uma dose única (0,1 mL/Kg) do analgésico dipirona sódica (Dipirona Ibase 50%, Ibase, Porto Alegre, RS, Brasil) por gavagem.

Análise biomecânica

Após a eutanásia, as tíbias direitas foram removidas e estabilizadas em uma pequena morsa. Uma chave hexagonal foi conectada tanto no implante como no torquímetro (Tohnichi, modelo ATG24CN-S, Tóquio, Japão) e realizado um movimento anti-horário com o objetivo de desrosquear o implante. O pico máximo necessário para movimentar o implante foi anotado como o valor do torque de remoção. As avaliações foram realizadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais (LGP).

Avaliação microtomográfica

As tíbias esquerdas foram utilizadas para análise microtomográfica. Para isto, foram fixadas em formol a 10% por 48 horas e posteriormente armazenadas em Álcool 70°. Essas amostras foram escaneadas pelo microtomógrafo (Skyscan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50 Kv e 500 µA), passo de rotação de 0.3mm e filtro de cobre e alumínio. As imagens foram reconstruídas, reposicionadas espacialmente e analisadas por softwares específicos

(NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Bélgica). A região de interesse (ROI) foi definida como uma região retangular com 0,5 mm em torno de todo o implante. Esse ROI foi definido como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- 4,5 mm x 3,2 mm). Como os implantes colocados não receberam o *cover screw* em alguns casos houve a formação óssea dentro da plataforma protética. Para que esta formação óssea não interferisse com a análise da osseointegração foi definido um segundo ROI para remoção da área de plataforma. Com os resultados obtidos nos dois ROIs, foi possível definir a Área de formação óssea utilizando a fórmula: Área Total – Área Plataforma = Área de formação óssea (Fig.1). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, e os valores do volume do tecido ósseo ao redor dos implantes foi obtido na forma de porcentagem. Um examinador treinado e cego para os grupos experimentais executou essa análise (LGP).

Análise histométrica (BIC e BAFO)

As tíbias esquerdas, que foram anteriormente escaneadas, foram submetidas ao processo laboratorial para infiltração plástica em resina e obtenção de cortes não-descalcificados. As amostras foram incluídas em solução resinosa de glicometacrilato (Technovit 4000 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & CO., Wehrheim, Alemanha), cortadas e desgastadas por um sistema para cortes não-descalcificados (Exact-Cutting, System, Apparatebau GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de cortes com aproximadamente 50µm de espessura, que foram posteriormente corados com solução de Stevenel's Blue. Para a avaliação do padrão de osseointegração foram avaliados o percentual do contato osso/implante (%BIC) e da formação óssea entre as roscas dos implantes (%BAFO). As imagens dos implantes foram obtidas utilizando-se um

microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha), com aumento de 50x, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo (Leica Microsystems DFC-300-FX; Leica Reichert & Jung Products, Wetzlar, Germany). A determinação dos valores de %BIC e %BBT foi executada com auxílio de um software analisador de imagens (Image J, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA), por um examinador cego e treinado para essa análise (LGP).

Descrição histológica

As peças remanescentes da análise biomecânica foram fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas, descalcificadas em EDTA a 7% por 12 semanas e foram posteriormente processadas para inclusão em parafina. Foram executados cortes paralelos ao longo eixo dos sítios aonde o implante estava inserido gerando cortes com 4µm de espessura que foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram avaliadas as características do tecido ósseo formado ao redor dos implantes, presença e aspecto dos osteócitos e dos osteoblastos e a análise da maturação do tecido ósseo utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Germany) com aumento de 50x e 100x. A análise foi executada por um examinador treinado e cego para os grupos do estudo (GJO).

Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica que foi realizada para identificar e localizar a expressão das proteínas osteocalcina (OCN) e fator transformante de crescimento β 1

(TGF- β 1) por meio dos cortes descalcificados que foram montados em lâminas silanizadas (Dako, Santa Clara, CA, USA). Após a tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a recuperação antigênica em tampão citrato aquecido em micro-ondas por duas sessões de 10 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA) a 3% por 2 horas. Logo após os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários da OCN (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) e de TGF β 1 (RD biosystems, Minneapolis, MN, USA). Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados por PBS 1%, que foi o veículo utilizado para diluição dos anticorpos. Posteriormente os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) e corados pelo DAB (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Os cortes foram contracorados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos celulares. As imagens foram obtidas através de uma câmera acoplada a um microscópio de luz (Leica-Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) com aumento de 50x. Foi executado uma análise descritiva que teve como base um score para análise da extensão da coloração da intensidade dessas proteínas: ausente; leve; moderada; forte (Queiroz et al., 2008). As extensões da coloração foram registradas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais (GJO).

Análise estatística

O software Graphpad Prism 5 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para estatística. Os dados da análise biomecânica, microtomográfica e histométrica desse estudo foram numéricos e devido a isso o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar se os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. Os resultados desse teste determinaram que os dados estavam distribuídos de acordo com a normalidade ($p > 0.05$), então testes paramétricos foram aplicados para a análise inferencial dos dados. O teste de one-way Anova complementado por Tukey foi utilizado para a análise dos dados entre os grupos em cada período de tempo e para a análise variando os períodos de avaliação dentro de cada grupo. Todos os testes desse estudo foram aplicados com nível de confiança de 95%.

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizado um estudo que avaliou a utilização do medicamento ASU sobre a osseointegração de implantes em animais saudáveis com metodologia semelhante para análise histométrica (Oliveira et al., 2014). Levando-se em consideração uma diferença de 15% como a diferença mínima entre as médias de %BIC como estatisticamente significativa com um desvio padrão médio entre os grupos de 10.56, ao se aplicar o teste ANOVA estabelecendo o poder β do estudo em 0.75 e o poder α de 0.05, determinou-se uma amostra mínima de 10 animais por subgrupo para avaliação dos diferentes tratamentos.

Resultados

Análise Biomecânica

Foi verificado que a força de contra-torque para remoção dos implantes foi maior no grupo ART/ASU do que nos grupos ART e ASU no período de 30 dias ($p<0.05$). Adicionalmente foi verificado que com o aumento do período de observação ocorreu um aumento gradual na força de contra-torque de remoção dos implantes em todos os grupos avaliados ($p<0.01$) (Figura 6).

Microtomográfica

Foi verificado que os grupos ASU e ART apresentaram maior % de osso na região de interesse do que o grupo ART/ASU nos períodos de 15 e 60 dias. Adicionalmente foi verificado que o grupo CTR apresentou maior % de volume ósseo do que o grupo ART/ASU no período de 60 dias ($p<0.05$). Com relação a análise intragrupo, observou-se no grupo ASU uma redução do volume ósseo no período de 60 dias comparado com os períodos de 15 e 30 dias ($p<0.05$), enquanto que no grupo ART/ASU foi verificado um aumento do volume ósseo no período de 30 dias em relação ao período de 15 dias, e uma posterior redução no período de 60 dias em relação ao período de 30 dias ($p<0.05$).

Histométrica

Porcentagem de contato osso-implante (%BIC)

Foi verificado que os grupos ASU e ART/ASU apresentaram maiores valores de %BIC que o grupo ART no período de 60 dias ($p<0.05$). Também observou-se que o

grupo ASU apresentou maior %BIC que o grupo CTR aos 60 dias ($p < 0.05$) e o grupo ART/ASU apresentou maior %BIC que o grupo ART aos 30 dias ($p < 0.05$). Adicionalmente, foi verificado um aumento progressivo da %BIC em todos os grupos, entretanto esse aumento foi estatisticamente significativo apenas nos grupos ASU e ART/ASU (figura 2).

Porcentagem de área óssea entre as espiras do implante (%BAFO)

Foi verificado que os animais do grupo ART/ASU apresentaram maiores valores de %BAFO que os animais do grupo ART nos períodos de 30 e 60 dias ($p < 0.05$). Assim como nos dados de %BIC, foi verificado um aumento progressivo da %BAFO com o aumento dos períodos experimentais em todos os grupos, entretanto esse aumento foi estatisticamente significativo apenas nos grupos ASU e ART/ASU. Imagens representativas dos cortes não descalcificados de todos os grupos estão expostas na Figura 2.

Descrição histológica

As imagens representativas das imagens histológicas dos cortes descalcificados estão expostas na figura 3. Foi verificado no grupo CTR que aos 15 dias houve formação de novo tecido ósseo apresentando linhas de reversão que delimitavam a região de formação de osso novo que apresentavam osteócitos em formato arredondado e canais de havers em formação. Aos 30 dias foi observado uma redução aparente na quantidade de tecido necrótico devido a um intenso processo de remodelação óssea, ainda delimitado pelas linhas de reversão, que acarretou em um aumento na quantidade de matriz osteóide em início de fase de maturação com presença de osteócitos arredondados e canais de havers mais estruturados. Aos 60 dias observou-se que o osso

estava em avançado estado de maturação, com presença de osteócitos achatados e de poucos osteócitos arredondados na matriz osteóide e presença de canais de havers bem estruturados.

Em relação ao grupo ASU, foi verificado aos 15 dias uma substituição total do osso necrótico na região das roscas dos implantes, com presença de osso de aspecto de matriz osteóide, com osteócitos arredondados e com presença de canais de havers em formação associado a presença de tecido de granulação bem organizado. Aos 30 dias foi observado a presença de osso em estágio avançado de maturação, com presença de tecido de granulação reduzido e canais de havers bem estruturados e osteócitos arredondados e achatados. Aos 60 dias ocorreu quase que uma total substituição da matriz osteóide e ausência de linha de reversão. O tecido ósseo apresentou aspecto de osso maduro com presença de osteócitos achatados em sua maioria e presença de canais de havers bem estruturado de diâmetro reduzido.

No grupo ART foi observado que aos 15 e aos 30 dias a matriz osteóide estava progressivamente substituindo o osso necrótico que era abundante nesse momento, sendo que esses tecidos estavam separados por uma linha de reversão bem delimitada. O tecido novo apresentava formação de canais de havers ainda desorganizados, e presença de osteócitos arredondados. Aos 60 dias foi verificado um aumento na quantidade de osso vital que estava em processo de maturação com canais de havers bem estruturados e com presença de osteócitos achatados, entretanto ainda foi possível identificar a presença de osso necrótico.

No grupo ART/ASU foi observado que aos 15 dias a remodelação óssea estava avançada e intensa, aonde foi observado presença de matriz osteóide com presença de canais de havers em formação com osteócitos arredondados e ausência de osso

necrótico nas regiões das roscas. Aos 30 e 60 dias foi verificado a presença de osso em processo de maturação com presença de canais de havers bem estruturados associado a presença de osteócitos achatados, porém fora da região das roscas havia a presença de osso necrótico.

Imuno-histoquímica

A expressão das proteínas osteocalcina e TGF β 1 não foi diferente entre os grupos nos períodos de 15 e 30 dias. De uma forma geral a expressão dessas proteínas foi leve nesses dois períodos em todos os grupos. Aos 60 dias foi verificado uma marcação mais forte de osteocalcina no grupo CTR e uma marcação mais forte de TGF β 1 no grupo ASU. Imagens representativas da expressão dessas proteínas aos 60 dias estão exposta na figura 4.

Avaliação da artrite

As avaliações da região do joelho dos animais demonstraram nos grupos sem artrite (CTR e ASU) manutenção da integridade dos tecidos. Nos grupos com artrite houve destruição da cartilagem e presença de processo inflamatório, sendo que estes parâmetros foram mais evidentes no grupo ART, no grupo ART/ASU houve discreta presença de alteração no tecido ósseo e inflamação articular (figura 5).

Discussão

A osseointegração de implantes é um fenômeno altamente dependente do metabolismo ósseo, que pode ser alterado por medicamentos ou patologias (Diz et al., 2013; Kotsakis et al., 2015). A artrite reumatóide é uma doença sistêmica que altera o metabolismo ósseo, causando um atraso no processo de cicatrização desse tecido (Claes et al., 2012). Alguns medicamentos utilizados para o tratamento da artrite reumatoide (ex. Corticosteroides) podem induzir osteoporose (Keller et al., 2004; Claes et al., 2012), e também têm sido relacionados ao retardamento da cicatrização óssea (Tu et al., 2014). Como consequência, os pacientes diagnosticados com artrite reumatoide estariam suscetíveis a um processo mais lento ou até mesmo falha na osseointegração. Em estudo anterior executado por nosso grupo de pesquisa, verificamos que o ASU promoveu um maior contato osso-implante na região cortical da tíbia em ratos saudáveis após o período de 60 dias. É provável que este aumento do BIC esteja relacionado com a maior expressão dos fatores de crescimento BMP-2 e TGB- β 1 (Oliveira et al., 2014). A partir destes resultados, desenvolvemos a hipótese testada no presente estudo, que a administração do ASU poderia ter influência no processo de osseointegração de implantes em animais com artrite induzida por antígeno.

No nosso estudo, verificamos que o grupo ASU obteve maior %BIC em relação ao CTR no período 60 dias, já o grupo ART/ASU apresentou maior %BIC e %BAFO em relação ao grupo ART a partir do período 30 dias, o que confirmou os resultados histométricos do nosso estudo anterior (Oliveira et al., 2014). De acordo com a análise de descrição histológica, observamos que o grupo ASU apresentou um processo de maturação óssea mais avançado em relação ao CRT e o grupo ART/ASU mostrou menor quantidade de tecido necrótico na região do implante em comparação ao grupo ART. O maior potencial de osseointegração dos grupos aonde o ASU foi administrado

pode estar relacionado ao seu potencial anti-inflamatório (Au et al., 2007; Christiansen et al., 2015) que pode reduzir a reabsorção do osso ao redor dos implantes durante a evolução da osseointegração e a capacidade desse tecido em estimular a proliferação do tecido conjuntivo (Boileau et al., 2009) diferentemente de outros medicamentos utilizados no tratamento da artrite reumatoide que agem como bloqueadores do processo inflamatório, atrasando a cicatrização óssea (Christiansen et al., 2015). A maior expressão de TGF β 1 em relação aos outros grupos no período de 60 dias, fato esse já verificado anteriormente (Oliveira et al., 2014) pode estar relacionada a capacidade do ASU em promover maior proliferação de tecido conjuntivo.

Na avaliação biomecânica de remoção dos implantes, os animais do grupo ART/ASU apresentaram valores de torque superiores aos grupos ART e ASU no período de 30 dias. Este resultado pode ser justificado através da análise histológica, em que observamos um atraso na cicatrização óssea com a presença de osso necrótico e início de formação de matriz osteóide no grupo ART. Já no grupo ASU observamos um avanço no processo de remodelação óssea, que poderia ser justificado pelos períodos modelamento e remodelamento, onde ocorre a redução da estabilidade primária tal como demonstrado em estudo com animais (Al-Nawas et al., 2006) e em humanos (Oliveira et al., 2016) e esse fato pode explicar a menor estabilidade momentânea desse grupo. Vale ressaltar que não houve diferenças entre os grupos no período mais longo de observação.

Nos dados da análise de microtomografia, o grupo ART/ASU obteve menores valores no período 15 dias em relação aos grupos ASU e ART, e no período 60 dias em relação aos grupos CTR, ASU e ART. Esses dados não confirmam o que foi demonstrado nas análises histométrica e histológica, no entanto, a análise tomográfica avalia apenas a formação óssea ao redor do implante, sendo limitada para avaliar a

osseointegração devido aos artefatos metálicos que impedem a visualização da interface osso/implante (Ejima et al., 2012). Outro fator importante para a compreensão desses dados é que durante a cicatrização de defeitos ósseos não críticos ou de fraturas em ossos longos, os períodos iniciais desse processo são marcados pela presença de abundante tecido ósseo trabecular na região do canal medular, e nos períodos mais tardios o osso retoma o seu formato natural com a presença de uma cortical espessa e canal medular oco (Chakkalakal et al., 1999; Uusitalo et al., 2001) e talvez a menor quantidade de osso na área circunvizinha do implante na realidade signifique um estágio mais avançado de cicatrização óssea. Dessa forma, pode-se entender que o ASU agiu de forma diferente nos grupos de acordo com a presença ou não de artrite, pois no grupo ART/ASU houve redução da quantidade de osso ao redor dos implantes, enquanto o grupo ASU não alterou esse parâmetro em relação ao grupo CTR. Serão necessários estudos que investiguem a fundo o comportamento da osteogênese a distância dos implantes para entender esse fenômeno.

Temos que salientar algumas limitações deste nosso estudo, como o modelo experimental em animal de pequeno porte, onde foi necessário o desenvolvimento de microimplantes e dosagem de medicamento compatível, sendo incompatível com o protocolo utilizado na prática clínica, a concentração de ASU utilizado nos espécimes pode não ter sido a ideal, não descartando que concentrações maiores do medicamento poderiam ter melhores resultados na cicatrização. Outra limitação é que nesse estudo não houve a comparação da administração do ASU com outros medicamentos classicamente utilizados para tratamento de artrite reumatoide pois clinicamente os pacientes que procuram a reabilitação com implantes dentários e são portadores dessa doença normalmente utilizam corticosteroides. De acordo com os resultados obtidos e a

metodologia utilizada pode-se concluir que o tratamento com ASU favoreceu a osseointegração, principalmente nos animais que apresentavam artrite induzida.

Referencias

- 1- Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2005 Mar; 4 (3): 130-6.
- 2- Al-Nawas B, Wagner W, Grötz KA. Insertion torque and resonance frequency analysis of dental implant systems in an animal model with loaded implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006 Sep-Oct; 21 (5): 726-32.
- 3- An YH, Friedman RJ, Jiang M, LaBreck JC, Draughn RA, Butehorn HF 3rd, Bauer TW. Bone ingrowth to implant surfaces in an inflammatory arthritis model. *J Orthop Res.* 1998 Sep; 16 (5): 576-84.
- 4- Andriamanalijaona R, Benateau H, Barre PE, Boumediene K, Labbe D, Compere JF, Pujol JP. 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 Jul; 77 (7): 1156-66.
- 5- Au RY, Al-Talib TK, Au AY, Phan PV, Frondoza CG. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Nov; 15 (11): 1249-55.
- 6- Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C, Pelletier JP. 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 Res Ther.* 2009; 11 (2): R41.

- 7- Catrina AI, Joshua V, Klareskog L, Malmström V. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2016 Jan; 269 (1): 162-74.
- 8- Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McGuire MH. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone.* 1999 Sep; 25 (3): 321-32.
- 9- Christiansen BA, Bhatti S, Goudarzi R, Emami S. Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables. *Cartilage.* 2015 Jan; 6 (1): 30-44.
- 10- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 2012. Jan. 31; 8 (3): 133-43.
- 11- Diz P, Scully C, Sanz M. Dental implants in the medically compromised patient. *J Dent.* 2013. Mar; 41 (3): 195-206.
- 12- Ejima K, Omasa S, Motoyoshi M, Arai Y, Kai Y, Amemiya T, Yamada H, Honda K, Shimizu N. Influence of metal artifacts on in vivo micro-CT for orthodontic mini-implants. *J Oral Sci.* 2012 Mar; 54 (1): 55-9.
- 13- Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol.* 2010 Aug; 10 (8): 605-11.
- 14- Keller JC, Stewart M, Roehm M, Schneider GB. Osteoporosis-like bone conditions affect osseointegration of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004. Sep-Oct; 19 (5): 687-94.
- 15- Kotsakis GA, Ioannou AL, Hinrichs JE, Romanos GE. A systematic review of observational studies evaluating implant placement in the maxillary jaws of medically compromised patients. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015 Jun; 17 (3): 598-609.
- 16- Krennmair G, Seemann R, Piehslinger E. Dental implants in patients with rheumatoid arthritis: clinical outcome and peri-implant findings. *J Clin Periodontol.* 2010 Oct; 37 (10): 928-36.

- 17- Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil AL, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, Guillou B, Pellat B, Godeau G. 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 Dec; 72 (12): 1685-94.
- 18- Maheu E, Cadet C, Marty M, Moyses D, Kerloch I, Coste P, Dougados M, Mazières B, Spector TD, Halhol H, Grouin JM, Lequesne M. Randomised, controlled trial of avocado-soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis.* 2014 Feb; 73 (2): 376-84.
- 19- McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol.* 2016. Jan; 12 (1): 63-8.
- 20- Oliveira GJ, de Paula LG, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Spolidório LC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RA. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014 Jul-Aug; 29 (4): 949-57.
- 21- Oliveira GJ, Paula LG, Souza JA, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Marcantonio RA. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on ligature-induced bone loss and bone repair after ligature removal in rats. *J Periodontal Res.* 2015 Aug 6. doi: 10.1111/jre.12312.
- 22- Oliveira GJ, Leite FC, Pontes AE, Sakakura CE, Junior EM. Comparison of the Primary and Secondary Stability of Implants with Anodized Surfaces and Implants Treated by Acids: A Split-Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016 Jan-Feb; 31 (1): 186-90.
- 23- Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010. Feb; 148 (2): 247-56.

- 24- Sennerby L, Thomsen P. Tissue response to titanium implants in experimental antigen-induced arthritis. *Biomaterials*. 1993 May; 14 (6): 413-22.
- 25- Sparks JA, Chang SC, Deane KD, Gan RW, Demoruelle MK, Feser ML, Moss L, Buckner JH, Keating RM, Costenbader KH, Gregersen PK, Weisman MH, Mikuls TR, O'Dell JR, Holers VM, Norris JM, Karlson EW. Associations of smoking and age with inflammatory joint signs among first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Results from the Studies of the Etiology of RA. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Feb 11. doi: 10.1002/art.39630.
- 26- Tu J, Henneicke H, Zhang Y, Stoner S, Cheng TL, Schindeler A, Chen D, Tuckermann J, Cooper MS, Seibel MJ, Zhou H. Disruption of glucocorticoid signaling in chondrocytes delays metaphyseal fracture healing but does not affect normal cartilage and bone development. *Bone*. 2014. Dec; 69:12-22.
- 27- Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jämsä T, Tuukkanen J, KäHäri V, Vuorio E, Aro HT. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone*. 2001. Apr; 28 (4): 423-9.

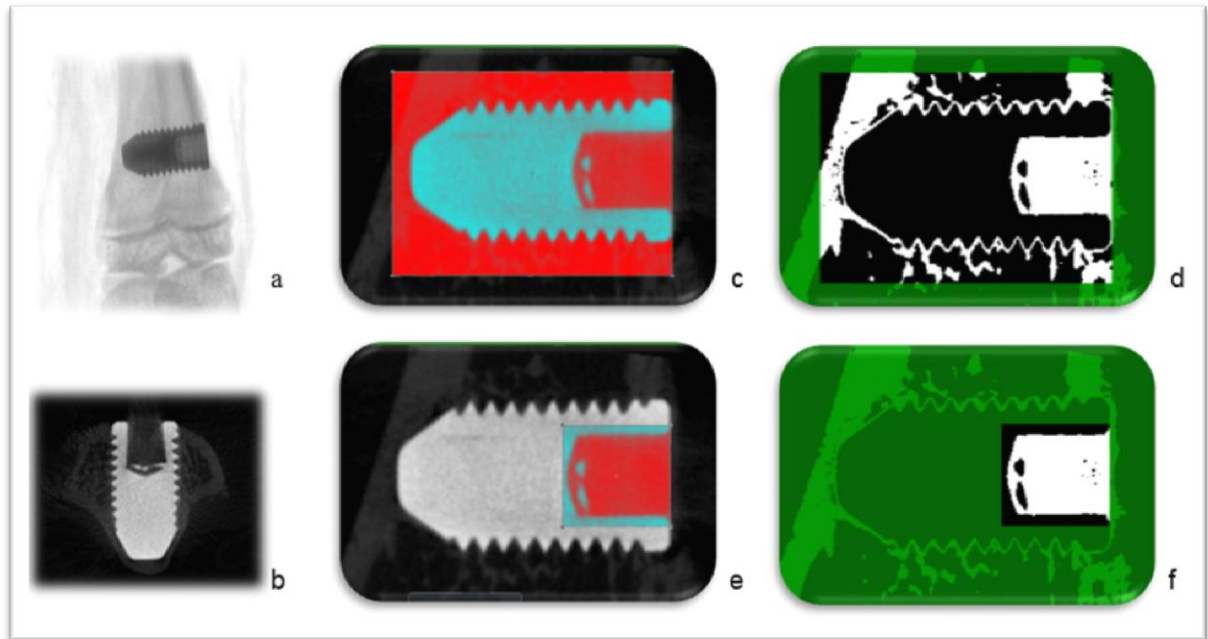


Figura 1 – Análise microtomográfica. a- tíbia com implante imagem em 2D, b- imagem reconstruída do implante na tíbia em 2D; c- Definição do ROI, d- imagem binalizada do ROI, e- definição da Área de Plataforma; f- imagem binalizada da área da Plataforma delimitada pelo ROI .

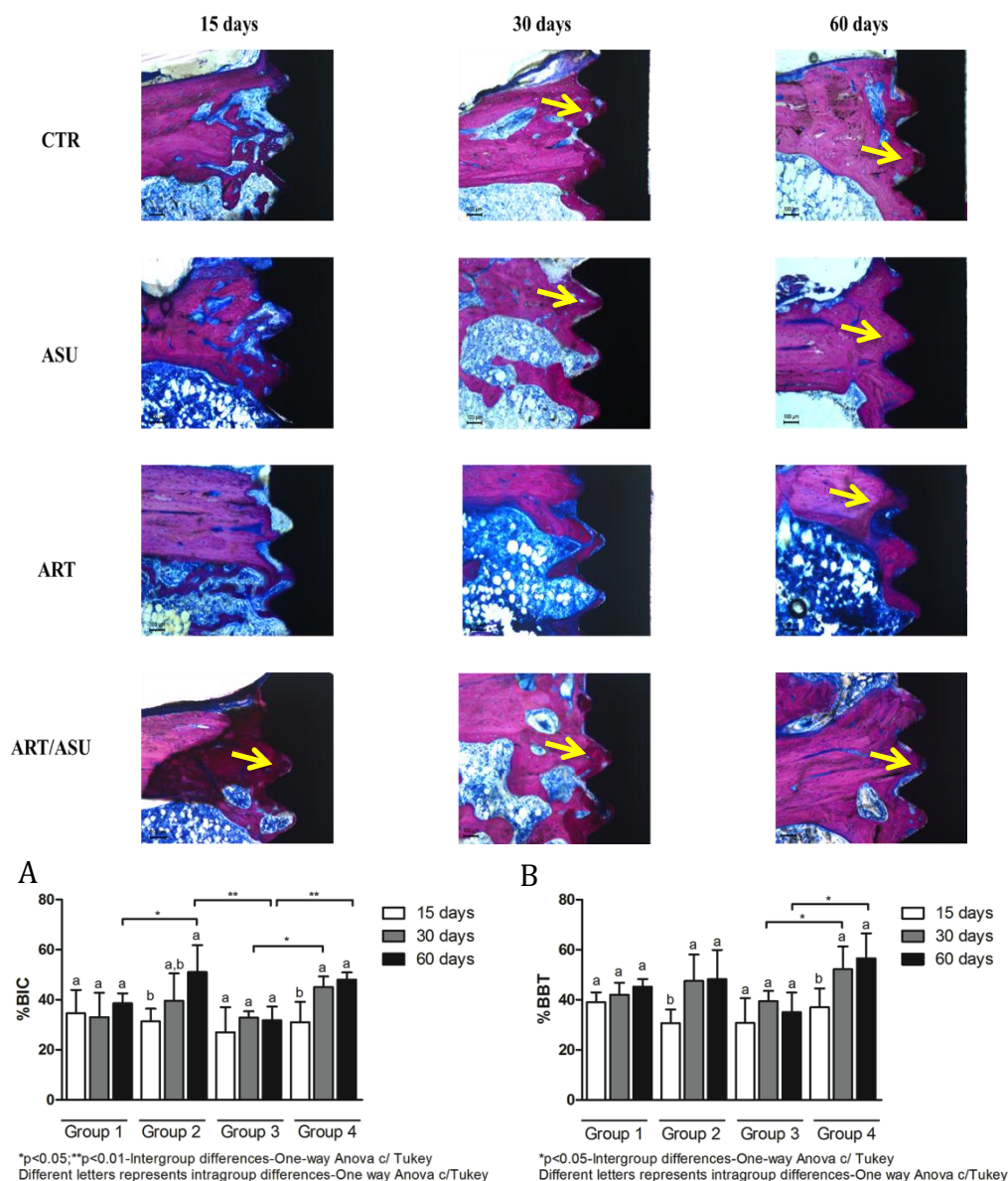


Figura 2: Paineis com cortes histomicrograficos representativos das secções não descalcificadas das regiões de metáfise tibial com implantes utilizados na avaliação histomorfométrica de acordo com cada grupo (CTR, ASU, ART, ART/ASU) e respectivos períodos de avaliação. Flechas representam regiões de espiras dos implantes com preenchimento ósseo. A-gráfico da análise quantitativa da %BIC. B-gráfico da análise quantitativa da %BAFO. Coloração Stevenel's Blue/fucsina ácida. 10x.

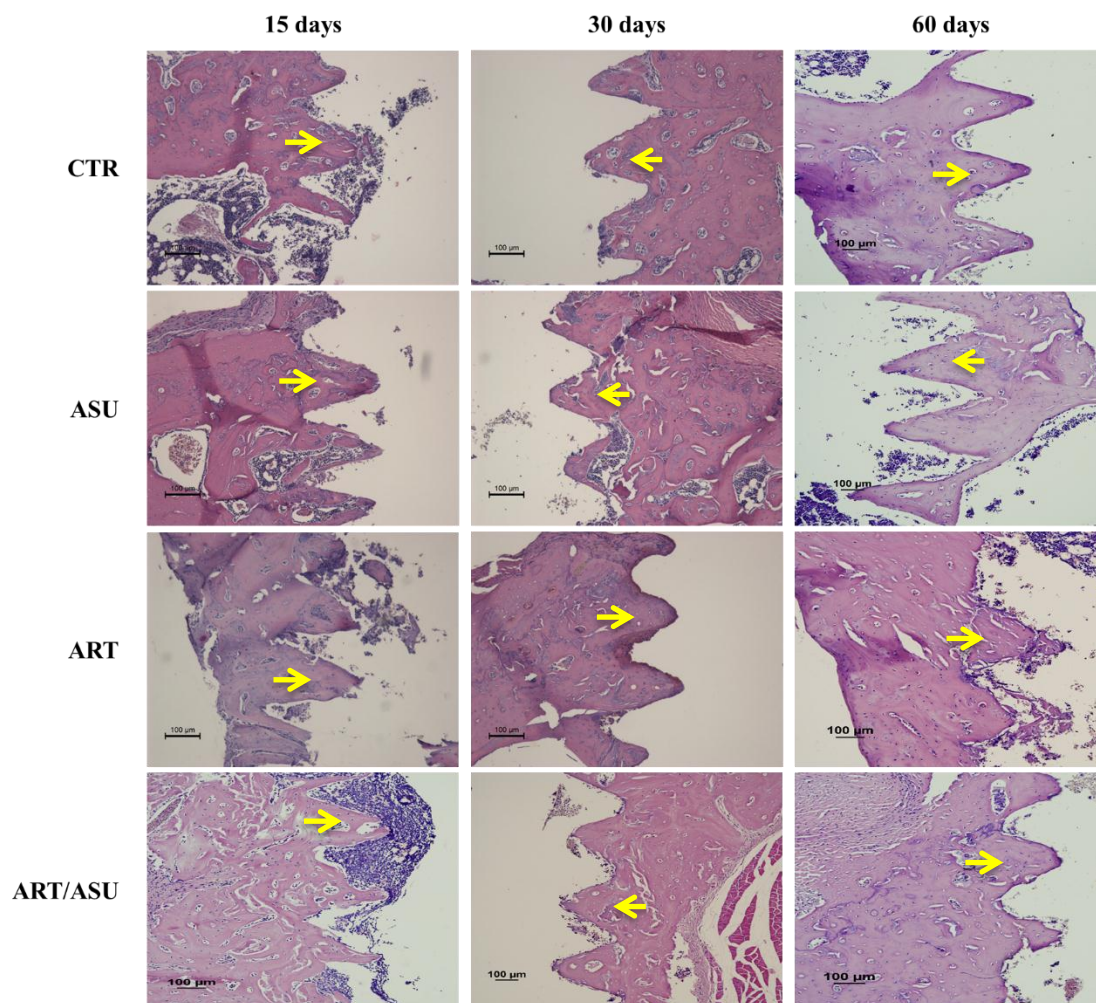


Figura 3: Pannel com histomicrografias representativas de cortes descalcificados utilizados na avaliação histológica de acordo com cada grupo (CTR, ASU, ART, ART/ASU) e respectivos períodos de avaliação. Flechas nas áreas com formação de novo osso representando o preenchimento das áreas das espiras dos implantes. H/E, 10X

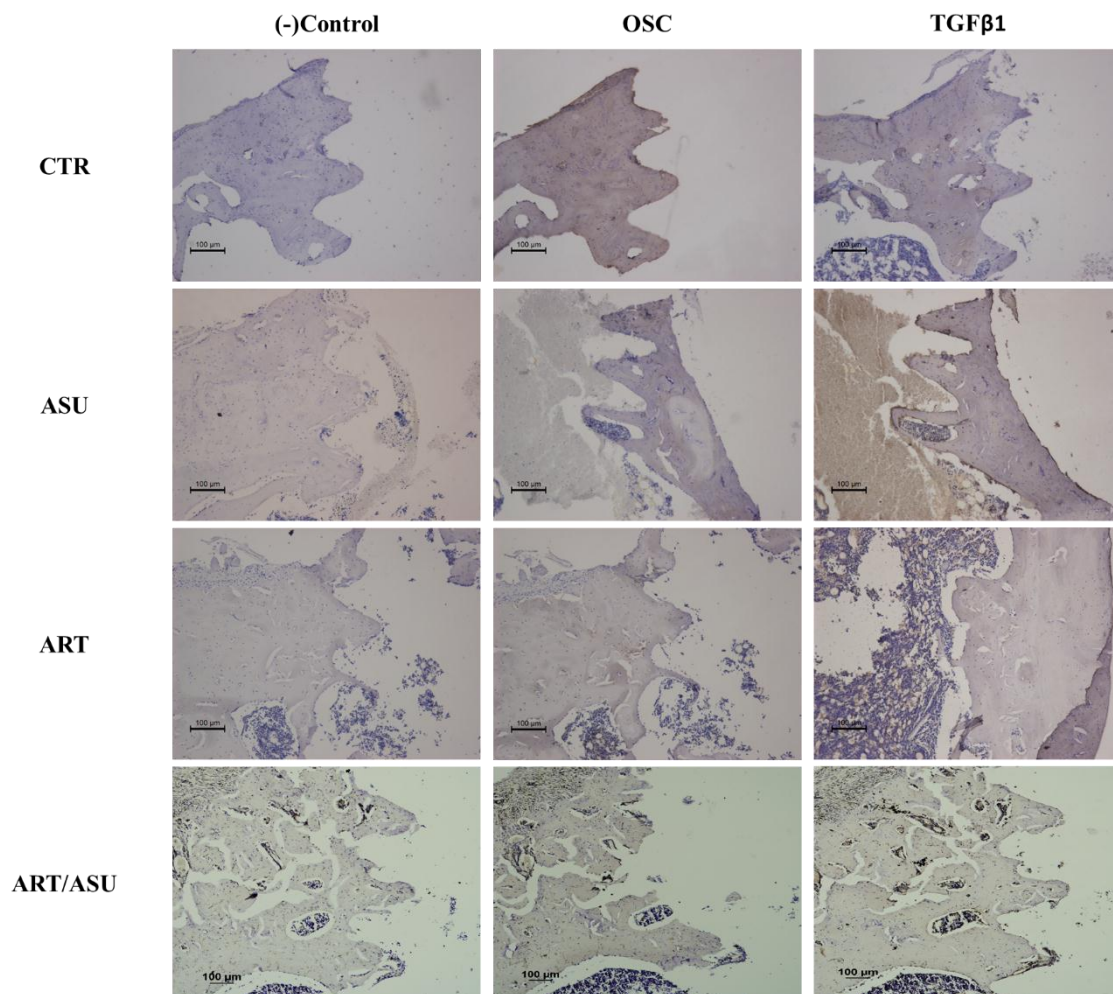


Figura 4: Paineis com histomicrografias representativas de cortes descalcificados utilizados na análise de imuno-histoquímica de acordo com cada grupo (CTR, ASU, ART, ART/ASU) e respectivos períodos de avaliação. Controle (-), OCN e TGF-β1 em todos os grupos. (10X).

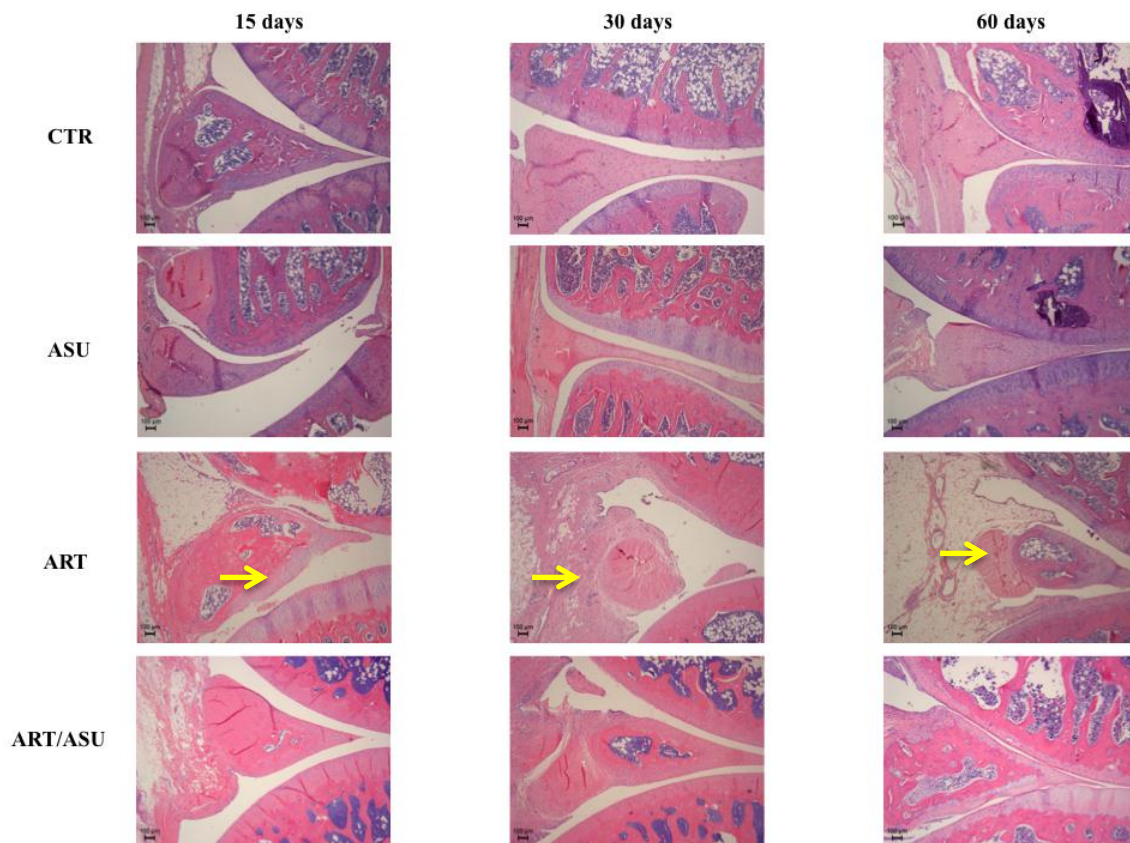


Figura 5: Fotomicrografia da região de joelhos dos animais. Os grupos CTR e ASU não apresentaram degradação dos tecidos nem processo inflamatório. Os grupos ART/ASU e ART apresentaram destruição óssea e inflamação articular (flecha), sendo que no grupo ART/ASU estes processos foram de menor intensidade, principalmente no período de 60 dias. (H/E, 5X).

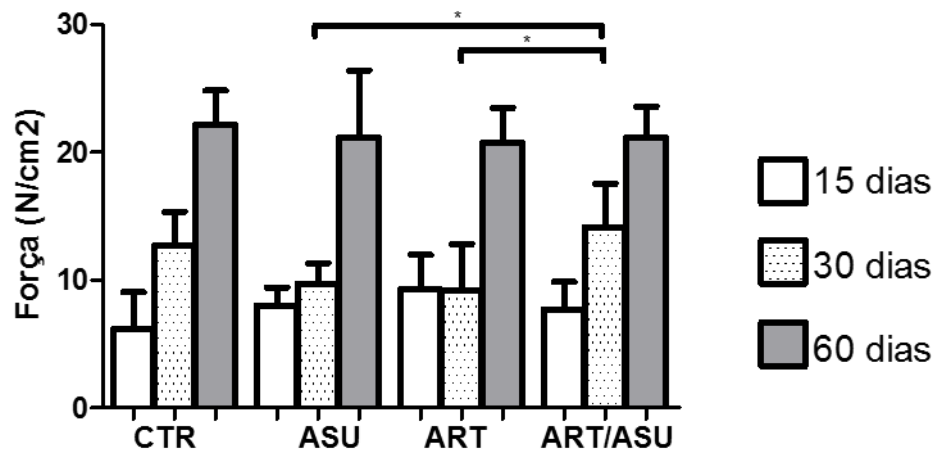


Figura 6: Média e desvio padrão de todos os grupos com relação ao contra-torque de remoção dos implantes (N/cm²). *p<0.05-Teste de Tukey

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a utilização do ASU na osseointegração *in vivo*, em condições com e sem artrite.

Embora os estudos tenham sido realizados em modelo experimental de animais de pequeno porte, que apresentam como limitações a utilização de microimplantes, a dosagem utilizada e a concentração do medicamento, condições metodológicas que, embora utilizados com parâmetros o mais próximo do indicado clinicamente, não pode ser extrapolado em seres humanos.

Os resultados demonstraram que este medicamento interfere positivamente na osseointegração de implantes. Nos animais sem doença houve maior formação de tecido ósseo ao redor dos implantes, sendo que, nos animais que usaram o medicamento, apresentando um padrão de cicatrização óssea mais madura. Estes resultados podem estar relacionados com a o estímulo dos fatores de crescimento e o bloqueio das citocinas inflamatórias que podem ter acelerado o processo de remodelação óssea (Andriamanalijaona et al.³, 2006; Au et al.⁵, 2007; Heinecke et al.¹⁷, 2010), com diminuição da reabsorção óssea induzida pela necrose após a instalação do implante, permitindo uma formação óssea mais rápida nos grupos ASU.

Na presença da artrite os resultados demonstraram melhora nos parâmetros histológicos e histométricos quando utilizou-se o medicamento em animais com artrite induzida. De acordo com a análise de descrição histológica, observamos que o grupo ASU apresentou um processo de maturação óssea mais avançado em relação ao CRT e o grupo ART/ASU mostrou menor quantidade de tecido necrótico na região do implante em comparação ao grupo ART. O maior potencial de osseointegração dos grupos aonde o ASU foi administrado pode estar relacionado ao seu potencial anti-inflamatório (Au et

al.⁵, 2007; Christiansen et al.¹⁵, 2016) que pode reduzir a reabsorção do osso ao redor dos implantes durante a evolução da osseointegração e a capacidade desse tecido em estimular a proliferação do tecido conjuntivo (Boileau et al.⁹, 2009) diferentemente de outros medicamentos utilizados no tratamento da artrite reumatoide que agem como bloqueadores do processo inflamatório, atrasando a cicatrização óssea (Christiansen et al.¹⁵, 2016). A maior expressão de TGF- β 1 em relação aos outros grupos no período de 60 dias, fato esse já verificado anteriormente (Oliveira et al.³¹, 2014) pode estar relacionada a capacidade do ASU em promover maior proliferação de tecido conjuntivo.

Embora mais estudos devam ser realizados, principalmente em humanos, de acordo com os resultados obtidos e as metodologias utilizadas nos dois estudos pode-se concluir que o tratamento com ASU favoreceu a osseointegração, principalmente nos animais que apresentavam artrite induzida.

5 CONCLUSÃO

De acordo com as limitações deste estudo foi possível concluir que extrato de óleo insaponificável de abacate e soja:

- teve uma influência positiva na osseointegração dos implantes.
- teve uma influência positiva na osseointegração dos implantes em animais com artrite induzida.

***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(4): 347-59.
2. Albrektsson T, Lekholm U. Osseointegration: current state of the art. *Dent Clin North Am*. 1989; 33(4): 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(7): 1156-66.
4. Appelboom T, Schuermans J, Verbruggen G, Henrotin Y, Reginster JY. Symptoms modifying effect of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) in knee osteoarthritis. A double blind, prospective, placebo-controlled study. *Scand J Rheumatol*. 2001; 30 (4): 242-7.
5. 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. *OsteoArthritis Cartilage* 2007; 15(11): 1249-55.
6. Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 2008; 153(5): 992–1002.

⁴De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

7. Berthelot JM, Le Goff B. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint Bone Spine*. 2010; 77 (6): 537-41. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.04.015.
8. 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(3): 197-212.
9. 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 Res Ther*. 2009; 11(2): R41.
10. 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(1): 148-56.
11. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*. 1977; 20 (3): 841-50.
12. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hasson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prosthesis. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2): 81-100.
13. Brånemark R, Thomsen P. Biochemical and morphological studies on osseointegration in immunological arthritis in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997; 31 (3): 185-95.
14. Cameron J, Banko KM, Pierce WD. Pervasive negative effects of rewards on intrinsic motivation: the myth continues. *Behav Anal*. 2001 Spring; 24 (1): 1-44.

15. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(4): 399-408.
16. Haugeberg G, Uhlig T, Falch JA, Halse JI, Kvien TK. Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 394 patients in the Oslo County Rheumatoid Arthritis register. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(3): 522-30.
17. 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. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(2): 220-7.
18. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Reveille JD; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(1): 15-25. doi: 10.1002/art.23177.
19. Henrotin YE, Labasse AH, Jaspard 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(1): 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(8): 1825-34.

21. Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(8): 605-11.
22. Krennmair G, Seemann R, Piehslinger E. Dental implants in patients with rheumatoid arthritis: clinical outcome and peri-implant findings. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(10): 928-36. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01606.
23. Lane NE, Sanchez S, Modin GW, Genant HK, Pierini E, Arnaud CD. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J Clin Invest.* 1998; 102 (8): 1627-33.
24. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratamento de periodontia clínica e implantodontia oral. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
25. 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(2): 191-7.
26. Maheu E, Cadet C, Marty M, Moyse D, Kerloch I, Coste P, et al. Randomised, controlled trial of avocado-soybean unsaponifiable (Piasclédine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(2): 376-84.
27. 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.
28. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(6): 429-42.

29. 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(1): 35-42.
30. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17 Suppl 2:97-103.
31. Oliveira GJ, de Paula LG, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Spolidório LC, Marcantonio E Jr, et al. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014; 29 (4): 949-57. doi: 10.11607/jomi.3498.
32. Pavelka K. ASU (piasclidine) in treatment of osteoarthritis - New findings about possible effects on structural progression. *Rheumatologia.* 2011; 25: 33-37.
33. Passoni BB, Marques de Castro DS, de Araújo MA, de Araújo CD, Piatelli A, Benfatti CA. Influence of immediate/delayed implant placement and implant platform on the peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res.* 2016. 1-8. doi: 10.1111/clr.12750
34. Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA Jr, Cunha FQ, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010; 148(2): 247-56.
35. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66(6): 1233-40.
36. Sennerby L, Thomsen P. Tissue response to titanium implants in experimental antigen-induced arthritis. *Biomaterials.* 1993; 14 (6): 413-22.
37. Westhovens R; Dequeker J. Rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Zeitschrift für Rheumatologie,* 2000; 59(1): 133-8.

38. 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(1): 15-22.
39. Yokokoji M, Fujimoto T, Ohya M, Ueda M. Dental Implants for an Elderly Patient with Rheumatoid Arthritis taking Long-term Steroids. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 21(3-4): 123-6.
40. Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J*. 2011; 30(7): 1357-75.

APÊNDICE 1

Material e Método

Estudo 1 – Avaliar as respostas teciduais da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja durante a osseointegração.

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 B).

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:

CTL - instalação de implantes nas tíbias e administração de soro fisiológico por gavagem.

ASU 1 - administração de extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine[®]300, Expanscience Lab, France) aplicado 0,6g/Kg/dia por gavagem (Yaman et al, 2007) 7dias antes da instalação dos implantes na região da tíbia.

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).

Figura 2 – Procedimentos cirúrgicos.



Fonte: Elaboração própria.

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 implantes (Clokic, Warshawsky, 1995), todos os animais foram sacrificados. Para cada grupo os animais foram randomicamente subdivididos e as tíbias foram separadas de acordo com as avaliações (Tabela 1), a saber:

Tabela 1 - Divisão dos animais.

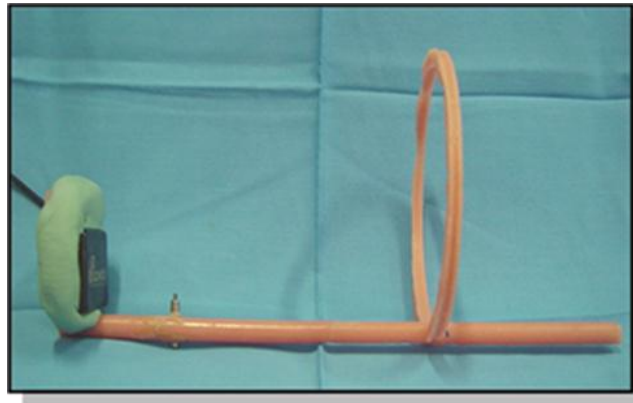
GRUPOS	CTL	ASU 1	ASU 2
NÚMERO DE ANIMAIS	10	10	10
ANÁLISE BIOMECÂNICA, HISTOLÓGICA E IMUNO-INFLAMATÓRIA	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOMORFOMÉTRICA	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS

Fonte: Elaboração própria.

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 baseline) e no dia do sacrifício dos animais (imagem final). Antes da sutura dos tecidos moles, as tíbias foram 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.

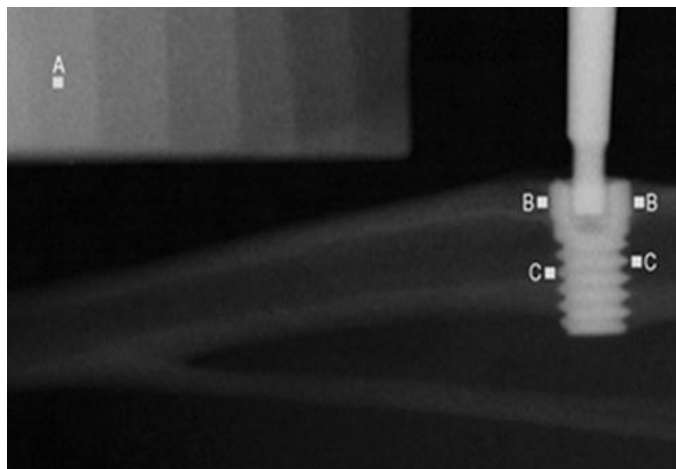
Figura 3 - Posicionador de radiografia.



Fonte: Elaboração própria,

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, usado como um RI de referência. O RI de referência também foi medido em uma área de 4 x 4 pixels, colocado 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.



Fonte: Elaboração própria.

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.

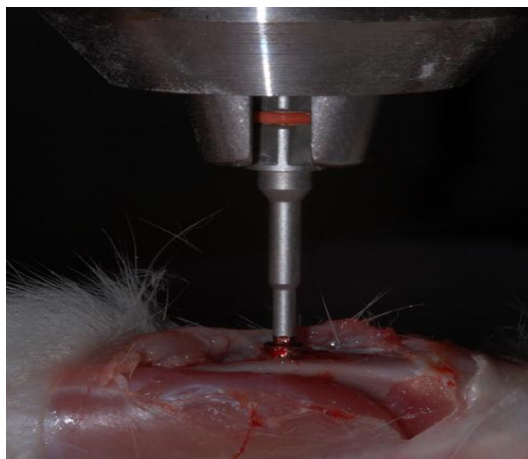
A reprodutibilidade avaliadora também foi acessada usando os dados brutos e teste de correlação de Pearson. Dois valores (lado direito e lado esquerdo) do RI cortical e do RI medular foram obtidos para cada implante, e a média destes dois valores foram utilizadas para representar o valor do RI espacial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



Fonte: Elaboração própria.

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 Donath (1982). 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 histomorfométrica foram realizadas com o software para análise de imagem (UTHSCSA ImageTool[®] versão 3.0 – Health Science Center – Texas University – 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 4µm foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

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 IMUNO-INFLAMATÓRIA

As peças remanescentes da análise biomecânica foram utilizadas para avaliação imuno-histoquímica que foi realizada para identificar e localizar a expressão de proteínas relacionadas com a remodelação óssea: proteína morfogenética óssea (BMP-2), fator transformante de crescimento β 1 (TGF- β 1) e osteocalcina (OCN). Os

cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas, seguido de tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e hidratação. Em seguida os cortes foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA) a 3% por 120 minutos. Logo após os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários. Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados por IgG normal, em substituição aos anticorpos primários nas mesmas diluições aplicadas aos mesmos. Posteriormente os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados pelo DAB. Os cortes foram contracorados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos celulares. As análises da expressão dos anticorpos foram executadas através um índice de extensão de marcação proteica utilizado por Queiroz et al. (2008): (0) sem marcação; (1) marcação fraca; (2) marcação moderada; (3) marcação forte. Foram avaliados 3 cortes por amostra e a mediana da análise foi considerada o valor amostral para cada anticorpo. As análises foram executadas por um examinador cego e treinado para essa análise.

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 respeitassem 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 confiança de 95%.

APÊNDICE 2

Estudo 2 - Avaliar as respostas teciduais da utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja durante a osseointegração, em animais com artrite induzida.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Proc. CEUA nº09/2012) (Anexo C).

Neste estudo foram utilizados 120 ratos machos (*Rattus Norvegicus*), variação albinus, Holtzman, pesando de 300 - 330g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP onde foram alimentados com ração sólida e com acesso a água ad libitum, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com água, luz e temperatura controladas.

INDUÇÃO DA ARTRITE EXPERIMENTAL

Foi utilizado um modelo sugerido de artrite experimental induzida (AIA) por antígeno e foi realizado em 2 etapas (Pinto et al.³⁴, 2010; Brackertz et al.¹¹, 1977):

1) Imunização e 2) Desafio intra-articular.

➤ Imunização

A imunização foi realizada através da administração de antígeno albumina de soro bovino metilada (mBSA). Os animais foram sensibilizados com 2 aplicações subcutâneas de 500 µg de mBSA (Sigma, St. Louis, MO) diluídos em 0,2 mL de uma emulsão contendo 0.1mL de solução salina e 0,1 mL de solução adjuvante de Freund completo (Sigma, St. Louis, MO) com intervalo de 7 dias entre as aplicações (Figura 1).

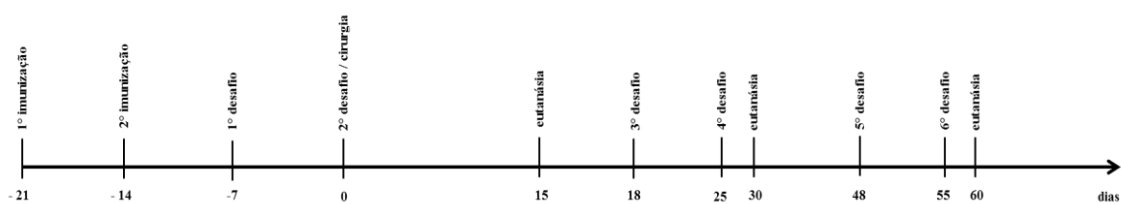
Os animais não imunizados receberam injeções de solução salina nos mesmos períodos dos animais imunizados.

➤ Desafio Intra-Articular

Após 7 dias da última aplicação subcutânea do antígeno (período de imunização) (Figura 1) a artrite foi induzida através da aplicação intra-articular do antígeno mBSA (10µg/cavidade articular) diluído em 10 µL de PBS na articulação da pata traseira direita e esquerda. As aplicações foram realizadas com intervalo de 7 dias (Figura 1). Os animais que não receberam o desafio intra-articular receberam injeções de solução salina.

Para realização destes procedimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano (5% com O₂ para indução e 3% de O₂ para manutenção) (Baxter Helthcare Corporation, Deerfield, IL), utilizando um vaporizador de isoflurano (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EUA).

Figura 1 - Delineamento Indução da Artrite Experimental.



Fonte: Elaboração própria.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 4 grupos:

GRUPO CONTROLE (CTR) - Os animais sem artrite, colocação de implantes na região de tíbia e administração do soro fisiológico.

GRUPO MEDICAMENTO (ASU) - Sem indução de artrite, colocação de implantes na região de tíbia e administração de extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine 300, Expanscience Lab, France) aplicado 0.6 g/kg/dia por gavagem 7 dias antes da colocação dos implantes na região de tíbia.

GRUPO ARTRITE (ART) - Os animais submetidos à indução da artrite, colocação de implantes na região de tíbia e administração do soro fisiológico 7 dias antes da colocação dos implantes.

GRUPO ARTRITE E MEDICAMENTO (ART/ASU) - Indução da artrite, colocação de implantes na região de tíbia e administração de extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine 300, Expanscience Lab, France) aplicado 0.6 g/kg/dia por gavagem 7 dias antes da colocação dos implantes na região de tíbia.

Os períodos até a eutanásia foram de 15, 30 e 60 dias após a colocação dos implantes osseointegrados. A administração do medicamento foi realizada uma vez ao dia até a eutanásia dos animais.

AVALIAÇÃO DA ARTRITE

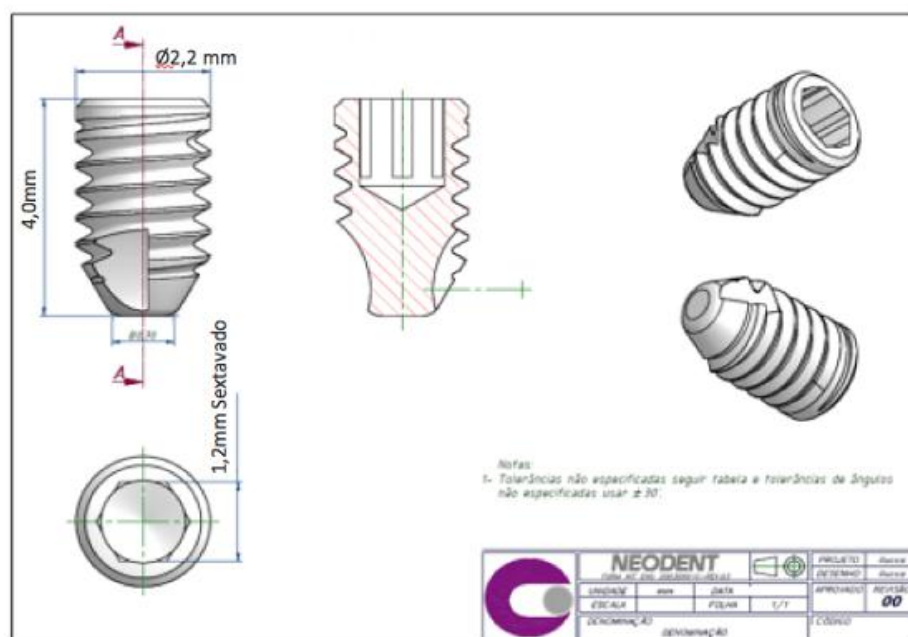
A inflamação da articulação do joelho foi avaliada histologicamente. Para este propósito, as articulações do joelho totais foram isoladas no ponto final (Figura 1 -

dia 30), fixada durante 48 horas em paraformaldeído a 4% (PFA), em seguida, descalcificadas em 10% de solução de EDTA (pH 7,4 em PBS) e embebidos em parafina. Cortes sagitais seriados de 6µm foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e marcados de forma cega em uma escala de 0-3 pontos de acordo com parâmetros diferentes: espessura sinovial, infiltrado inflamatório e de erosão da cartilagem/osso.

ESPECIFICAÇÃO DOS IMPLANTES

Foram utilizados microimplantes especialmente desenvolvidos para o projeto. Os implantes utilizados nesse trabalho são de superfície usinada de titânio, o tamanho e o formato dos implantes foram especialmente desenhados para a instalação na tíbia de ratos (Figura 2).

Figura 2- Desenho dos implantes



Fonte: Neodent

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 mL/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Agener União) e 0,04 mL/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina, Rompum - Bayer). Posteriormente, submetidos à tricotomia da região interna das pernas direita e esquerda e realizada a antisepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona (PVPI Tópico 10% - Rioquímica).

Uma incisão de aproximadamente 10 mm realizada em planos, sobre a metáfise tibial. Após uma dissecação delicada, o tecido ósseo foi submetido à osteotomia utilizando uma fresa lança de 2,0 mm (Neodent). Todas as perfurações realizadas com motor elétrico, ajustado a 1200 rpm, sob abundante irrigação com solução salina estéril. O implante foi instalado com a ajuda de uma chave digital (Neodent). O ferimento foi suturado em planos, internamente com fio reabsorvível (Vicryl 5.0, ETHICON, Johnson Prod.) e externamente com fio de seda (Seda 4.0, ETHICON, Johnson Prod.).

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

Os animais foram eutanaziados após os períodos de 15, 30 e 60 dias com sobredose de hidrato de cloral a 20% e uma tíbia de cada animal foi removida para fixação em álcool 70% por um período de 24 horas antes do início do processamento para os cortes não descalcificados (tíbias aonde os implantes não foram removidos), ou para o processamento de cortes descalcificados (tíbias aonde os implantes foram removidos devido a análise biomecânica). Cada grupo era composto de 30 animais que

foram subdivididos em 10 animais por período experimental. A Tabela 1 expõe a divisão de animais e das análises executadas em cada grupo.

Tabela 1- Divisão dos animais.

GRUPOS	PERÍODOS	ANIMAIS	NÚMERO DE TÍBIAS	MICROTOMOGRÁFIA E HISTOMORFOMETRIA	TORQUE DE REMOÇÃO, HISTOLOGIA E IMUNO-INFALMATÓRIA
CTR	15 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	30 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	60 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
ASU	15 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	30 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	60 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
ART	15 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	30 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	60 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
ART/ASU	15 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	30 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS
	60 DIAS	10 ANIMAIS	20 TÍBIAS	10 TÍBIAS	10 TÍBIAS

Fonte: Elaboração própria.

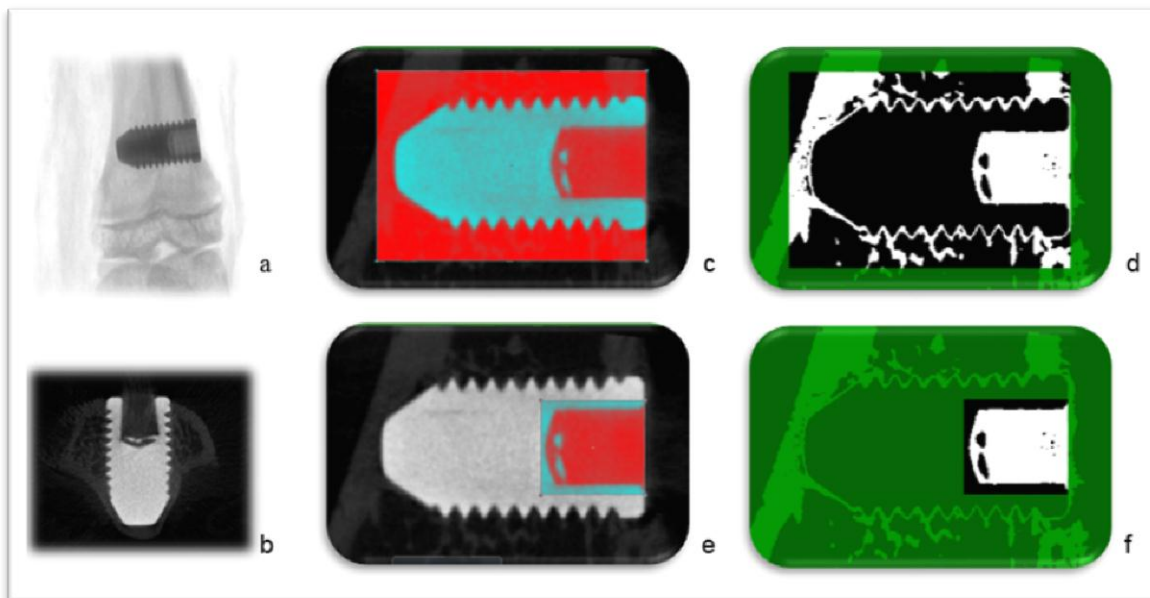
AVALIAÇÃO POR MICROTOMOGRÁFIA

As tíbias armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo (Skyscan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50 Kv e 500 µ), passo de rotação de 0.3mm e filtro de cobre e alumínio, que tem como função diminuir os artefatos gerados pelo metal do implante. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de

interesse pelo software NRecon (Figura 3a). No software Data Viewer (Figura 3b) as imagens foram reposicionadas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (Figura 3c) foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. Esta área ficou definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- 4,5 mm x 3,2 mm). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (*thershould*). O *thershould* (Figura 3d) utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, obtido por meio de testes visando a similaridade com tecido ósseo, possibilitando obter o volume de osso formado ao redor dos implantes. Como os implantes osseointegrados colocados não receberam o *Cover Screw* (vedante) em alguns casos houve a formação óssea dentro da plataforma protética. Para que esta formação óssea não interferisse com a análise da osseointegração foi definido um segundo ROI (Figura 3e, f) que compreendeu a região da plataforma protética (Área da Plataforma). Com os resultados obtidos nos dois ROIs, foi possível definir a Área de formação óssea utilizando a fórmula:

$$\textit{Área Total} - \textit{Área Plataforma} = \textit{Área de formação óssea}$$

Figura 3 - NRecon (a); Data Viewer (b); Ctan Definição do ROI (c), ROI (d), Área Plataforma (e); Área Plataforma delimitada pelo ROI (f).



Fonte: Elaboração própria.

O software CTAn, a partir da delimitação da região de interesse em 2D, promove a análise em 3D da mesma pela soma coletiva de todos os “ROI”s de um conjunto contíguo de fatias de imagens transversais. Deste modo foi obtido o percentual de volume do tecido ósseo presente nas áreas de interesse previamente delimitadas (ROIs). Os dados obtidos foram anotados em % de volume ao redor dos implantes.

AVALIAÇÃO DO TORQUE DE REMOÇÃO

Após a eutanásia, as tíbias foram removidas e estabilizadas em uma pequena morsa. Uma chave hexagonal foi conectada tanto no implante como no torquímetro (Tohnichi, modelo ATG24CN-S, Japão) e realizado um movimento anti-horário com o objetivo de desrosquear o implante. O pico máximo necessário para movimentar o

implante foi anotado como o valor do torque de remoção. As avaliações realizadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As tíbias que passaram pela análise microtomografia foram utilizadas para análise histomorfométrica. As peças foram imersas em paraformaldeído 4% e processadas de acordo com o método descrito por Donath (1982). Os blocos foram desidratados em uma série crescente de etanóis (60 – 100%) e posteriormente infiltrados e polimerizados em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraus 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 a fucsina ácida e analisadas em um microscópio óptico (DIASTAR – Leica Reichert & Jung products, Alemanha). As avaliações histomorfométrica foram realizadas com o software para análise de imagem (UTHSCSA ImageTool® versão 3.0 – Health Science Center, Texas University, EUA). As porcentagens de contato osso-implante (BIC) e de área óssea entre espiras (BAFO) foram avaliadas separadamente para a região cortical e endocondral.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a fixação das peças de tíbia em formol a 10 %, estas foram lavadas em água corrente por 12 h e colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um

período de 8 semanas, com trocas semanais. Depois foram lavadas e desidratadas em álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados paralelos ao longo eixo do implante. Os cortes com 4 µm de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram avaliadas, as reações inflamatórias do tecido conjuntivo e processos de reabsorção óssea, assim como presença de células inflamatórias, utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha).

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

As peças remanescentes da análise biomecânica foram utilizadas para avaliação imuno-histoquímica que foi realizada para identificar e localizar a expressão de proteínas relacionadas com a remodelação óssea: Fator transformante de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e osteocalcina (OCN). Os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas, seguido de tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e hidratação. Em seguida os cortes foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA) a 3% por 120 minutos. Logo após os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários. Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados por IgG normal, em substituição aos anticorpos primários nas mesmas diluições aplicadas aos mesmos. Posteriormente os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados pelo DAB. Os cortes foram contracorados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos celulares. As análises da expressão dos anticorpos foram executadas através um índice de extensão de marcação proteica utilizado por Queiroz et al.³⁵, 2008: (0) sem

marcação; (1) marcação fraca; (2) marcação moderada; (3) marcação forte. Foram avaliados 3 cortes por amostra e a mediana da análise foi considerada o valor amostral para cada anticorpo. As análises foram executadas por um examinador cego e treinado para essa análise.

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 4 N para que ocorressem diferenças estatisticamente significativas com alfa no valor de 0,05 e poder do teste de 80%. Os dados das análises biomecânica, histomorfométrica e microtomográfica são numéricos e devido a isso o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar se os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. Os resultados desse teste determinaram que os dados estavam distribuídos de acordo com a normalidade ($p > 0,05$) e devido a isso testes paramétricos foram aplicados para a análise inferencial dos dados. O teste Anova complementado por Tukey foi utilizado para a análise dos dados entre os grupos em cada período de tempo, enquanto que o teste de Repeated Measurements Anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a análise variando os períodos de avaliação dentro de cada grupo. Todos os testes desse estudo foram aplicados com nível de confiança de 95%.

ANEXO A - 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 – SYSADDOA).

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 B - Comitê de ética estudo 1



unesp



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 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@foar.unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

ANEXO C - Comitê de ética estudo 2



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 09/2012

Araraquara, 09 de Maio de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 09/05/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (piascledine) na ósseointegração e no tratamento da doença periodontal induzida em ratos" (Proc. CEUA nº 09/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MARÇO/2015, devendo o Pesquisador Responsável providenciar a correção do Protocolo Inicial, fazendo constar a dosagem da medicação a ser administrada aos animais, nos mesmos moldes que se encontra discriminada no projeto de pesquisa.

Atenciosamente.

Débora S. Almeida

Profª Drª DÉBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI
Vice-Coordenadora no exercício da Coordenadoria da CEUA

À

Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Jackeline do Nascimento Tsuramaki
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@foar.unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

Não autorizo a reprodução até 16/03/2018.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 16 de março de 2016.

LUIZ GUILHERME FREITAS DE PAULA