

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/02/2027

LETÍCIA PITOL PALIN

Efeito da *Bauhinia forficata* sistêmica e de biomoléculas aplicadas à superfície de implantes de titânio sobre a dinâmica óssea peri-implantar de ratos diabéticos tipo 2: um estudo translacional

LETÍCIA PITOL PALIN

Efeito da *Bauhinia forficata* sistêmica e de biomoléculas aplicadas à superfície de implantes de titânio sobre a dinâmica óssea peri-implantar de ratos diabéticos tipo 2: um estudo translacional

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutora.

Área de Concentração: Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Titular Dr^a. Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Titular Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho

**Araçatuba – SP
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P162e Palin, Letícia Pitol.
Efeito da Bauhinia forficata sistêmica e de biomoléculas aplicadas à superfície de implantes de titânio sobre a dinâmica óssea peri-implantar de ratos diabéticos tipo 2: um estudo translacional / Letícia Pitol Palin. – Araçatuba, 2025
121 f. : il. ; tab.

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

1. Diabetes Mellitus Tipo 2 2. Medicamento fitoterápico
3. Vitamina D 4. Implantes dentários 5. Modelos animais
I. T.

Black D7
CDD 617.64

Aos meus amados pais e avós,

Por todo apoio e dedicação ao longo de minha vida. Obrigada por sonharem os meus sonhos e me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos, devo cada pequena conquista a vocês. Vocês são minha maior referência de honestidade, integridade e a quem eu devo a capacidade de vencer os meus desafios, conquistar os meus objetivos e nunca desistir dos meus sonhos. Vos dedico a conclusão desta tão sonhada etapa acadêmica e que cada fruto colhido desta jornada seja partilhado com vocês.

Ao meu companheiro, Rafael

Agradeço pelos anos de união, amor e respeito. Dentre tantas pessoas nos escolhemos para compartilhar a vida e celebrar as conquistas de cada um. Agradeço por sua generosidade, incentivo, força e por viver mais este sonho ao meu lado.

A Deus

Pela força nos momentos de dificuldade e pelo amor ao que faço.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Professora Titular Dr^a. Roberta Okamoto

Por ser minha maior referência profissional, de ética e dedicação à pesquisa. Agradeço pela orientação ao longo desses mais de dez anos e pela dedicação com o meu desenvolvimento científico. Agradeço principalmente pelo acolhimento, por todas as oportunidades ao longo desses anos e também por me fazer acreditar em meu potencial. É uma grande honra poder chama-la de orientadora, mas principalmente em conhecer a senhora como pessoa. Levarei sempre parte da senhora comigo ao longo de minha carreira profissional.

Ao meu coorientador, Professor Titular Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho

Agradeço pelos ensinamentos e disponibilidade durante a execução deste trabalho, sua colaboração foi de grande importância para que eu pudesse concluir esta etapa. O senhor é uma grande inspiração e referência profissional da qual tive a honra de conhecer ao longo de minha formação acadêmica.

Aos membros da Banca Examinadora

Professor Dr. Hugo Nary Filho, Professor Dr. José Mauro Granjeiro, Professor Dr. Juliano de Almeida Milanezi e Professor Dr. Paulo Henrique Orlato Rossetti, agradeço pelo aceite em participar deste momento especial de minha vida acadêmica. A ciência foi algo que trouxe grandes mudanças em toda a minha trajetória profissional, assim como na de vocês. A escolha de vossos nomes trouxe uma alta responsabilidade na apresentação deste trabalho, assim como na validação deste título. Gostaria que soubessem que são grandes referências e inspirações profissionais pelo trabalho que desenvolvem com maestria. Serei eternamente grata e honrada pela disponibilidade, pelo tempo e pela oportunidade a mim conferidos.

A aluna de Iniciação Científica, Isadora Castaldi Sousa

Agradeço por toda disposição e ajuda durante a execução deste projeto, onde pudemos aprender muito uma com a outra. Você foi meu braço direito ao longo desses anos e sua proatividade e dedicação são qualidades que não posso deixar de mencionar. Hoje, fico feliz e orgulhosa em ver você se desenvolvendo cientificamente e com um lindo caminho pela frente. Espero que ainda tenhamos muitos frutos para colher juntas ao longo de nossas jornadas.

A Professora Titular Dr^a. Dóris Hissako Matsushita

Agradeço novamente pela disponibilidade durante a execução dos meus projetos de iniciação científica, mestrado e doutorado. A presença da senhora é muito agradável e proveitosa, e levarei esses momentos sempre com muito carinho.

Aos amigos do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados

Agradeço por toda disposição e ajuda durante a execução deste projeto, pude aprender muito com cada um de vocês ao longo destes anos. A presença de vocês é sempre muito agradável e prazerosa, obrigada por cada risada nos momentos de dificuldade.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do diretor **Professor Titular Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do vice-diretor **Professor Associado Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**.

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

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de minhas duas bolsas de Iniciação Científica e suas respectivas renovações (Processos nº: 2014/15396-0 e 2016/25747-0), assim como pelas bolsas de mestrado (Processo nº: 2019/01634-0) e doutorado (Processo nº: 2021/01082-7) a mim concedidas, bem como ao Auxílio à Pesquisa (Processo nº: 2021/13026-4) que subsidiou este trabalho.

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

Este estudo foi suportado pelo **CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** - INCT Saúde Oral e Odontologia – CNPq processo: 406840/2022-9; e pelo Auxílio Universal – CNPq processo: 404998/2023-2 em nome de minha orientadora, Professora Titular Dr^a. Roberta Okamoto, que fomentou parte da análise de biologia molecular deste trabalho. Assim como as queridas **Sabrina Tfaile Frasnelli** e **Naara Gabriela Monteiro** pelo auxílio e realização da análise de biologia molecular com tanto carinho e dedicação.

Ao **Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO)** da FOA-UNESP, à **FINEP** (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 e 01.22.0385.00 – PROINFRA: 01/2011 e 0233/22) e à **UNESP** (Edital 13/2021- Unesp Presente) pelo uso dos equipamentos de Microtomografia Computadorizada, pelo Sistema de Microscopia Confocal e pelo Scanner de lâminas MoticEasyScan One, bem como às funcionárias **Natália Yoshie Ikegami** e **Giseli Mitsuy Kayahara** pelos escaneamentos das amostras e lâminas.

Ao **Laboratório de Materiais Avançados** do Departamento de Física e Meteorologia, localizado na Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, coordenado pelo

Prof. Titular Dr. Paulo Noronha Lisboa-Filho, pela fundamentação da técnica de funcionalização dos implantes e pela realização da Microscopia Eletrônica de Varredura dos discos de titânio.

Ao **Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC)** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP/São José dos Campos, coordenado pela **Professora Titular Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, pela realização dos testes de cultura de células. Assim como, à aluna de doutorado **Juliani Caroline Ribeiro De Araújo Souto** pela realização das análises.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** onde realizei os experimentos para o desenvolvimento deste projeto assim como os de iniciação científica. Obrigada aos **professores da Disciplina de Histologia e Embriologia** (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof^a Dr^a. Mariza Akemi Matsumoto, Prof^a Dr^a Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos **professores da Disciplina de Anatomia** (Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto), aos **funcionários** e todos os outros **estagiários**. Muito obrigada por toda ajuda e pelo acolhimento durante estes anos de convívio.

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

Aos meus queridos **professores** ao longo da graduação e pós-graduação, pessoas das quais admiro muito e me inspiro profissionalmente. Muito obrigada por toda dedicação com o ensino e ciência.

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

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

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

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade”

Marie Curie

RESUMO

PALIN, L. P. **Efeito da *Bauhinia forficata* sistêmica e de biomoléculas aplicadas à superfície de implantes de titânio sobre a dinâmica óssea peri-implantar de ratos diabéticos tipo 2: um estudo translacional.** 2025. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito de terapias sistêmicas e locais sobre o processo de reparo peri-implantar, buscando controlar efeitos negativos do diabetes tipo 2, promovendo diminuição da resposta inflamatória assim como os demais fatores que interferem o processo de formação e mineralização do tecido ósseo reparacional. Foram utilizados 128 ratos, divididos em: NG (normoglicêmicos; n=32); NGBf (normoglicêmicos + chá; n=32); T2D (diabéticos tipo 2; n=32) e T2DBf (diabéticos tipo 2 + chá; n=32). Cada grupo experimental foi dividido em dois subgrupos de acordo com o tratamento da superfície dos implantes (n = 16 por subgrupo): Ti – implantes convencionais de titânio grau IV com duplo ataque ácido e vD – implantes de titânio grau IV funcionalizados com vitamina D3. O T2D foi induzido pela associação da dieta de cafeteria e aplicação de estreptozotocina (35mg/kg). Após confirmação do T2D (198mg/dL), foi dado início ao tratamento com infusão de *Bauhinia forficata* (50g/L). A cirurgia de instalação dos implantes em tíbia foi realizada 15 dias após o início do tratamento, e passados 7, 14 e 28 dias da cirurgia foi realizada a eutanásia dos animais. Foram realizadas análise biomecânica, microtomográfica, histológica, de morfologia das fibras colágenas e RT-qPCR. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade com nível de significância de 5%. Os resultados apontam que a *Bauhinia forficata* foi capaz de promover, ainda que parcialmente, uma melhora significativa na condição sistêmica dos animais T2DBf. Na análise de biomecânica peri-implantar, é possível observar piores valores de torque de remoção em T2D:Ti e o uso do fitoterápico em T2DBf:Ti promoveu um aumento da força de remoção dos implantes de forma discreta, em contra partida, o uso de implantes funcionalizados em T2D:vD promoveu um aumento na força de remoção dos implantes, semelhante ao grupo NG:Ti. Na análise microtomográfica, o uso de *Bauhinia forficata* não promoveu diferenças na microarquitetura óssea peri-implantar, entretanto, o uso de implantes vD melhorou os parâmetros avaliados em todos os grupos experimentais. Na análise histológica da região peri-implantar, é possível

observar menor formação óssea em T2D:Ti, com reversão dessa característica tanto com o tratamento de *Bauhinia forficata*, como com o uso de implantes vD, o que impactou positivamente na morfologia das fibras colágenas. Ainda, a análise molecular apresentou aumento dos genes relacionados ao processo de mineralização com o uso de implantes funcionalizados em NG:vD e T2D:vD. Assim, pode-se concluir que a *Bauhinia forficata* atua de maneira positiva na etiopatogenia do diabetes tipo 2, além de melhorar as respostas celulares e teciduais, mesmo que de forma não suficiente para restabelecer as características da biomecânica óssea peri-implantar. Ainda, o sistema de administração baseado em drug-delivery com implantes funcionalizados com vitamina D3 foi capaz de reverter, mesmo que localmente, os eventos celulares envolvidos no reparo ósseo do modelo de diabetes tipo 2, restabelecendo a microestrutura e a biomecânica óssea peri-implantar.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; medicamentos fitoterápicos; vitamina d; implantes dentais; modelos animais.

ABSTRACT

PALIN, L. P. **Effect of systemic *Bauhinia forficata* and biomolecules applied to titanium implant surfaces on peri-implant bone dynamics of type 2 diabetic rats: a translational study.** 2025. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

The aim of this study was to evaluate the effect of systemic and local therapies on the peri-implant repair process, in order to manage the negative effects of type 2 diabetes, promoting a reduction in the inflammatory response as well as other factors that interfere with the process of formation and mineralization of reparative bone tissue. A total of 128 rats were used, divided into: NG (normoglycemic; n=32); NGBf (normoglycemic + tea; n=32); T2D (type 2 diabetics; n=32) and T2DBf (type 2 diabetics + tea; n=32). Each experimental group was divided into two subgroups according to the surface treatment of the implants (n = 16 per subgroup): Ti - conventional grade IV titanium implants with double acid etching and vD - grade IV titanium implants functionalized with vitamin D3. T2D was induced by combining a cafeteria diet with streptozotocin (35mg/kg). After confirming T2D (198mg/dL), treatment was started with an infusion of *Bauhinia forficata* (50g/L). Surgery to install the implants in the tibia took place 15 days after the start of treatment, and the animals were euthanized 7, 14 and 28 days after surgery. Histological analysis, removal torque and microtomography (MicroCT) of the peri-implant region were carried out, as well as a three-point bending test and MicroCT of the femurs. The data was submitted to the normality test with a significance level of 5%. Biomechanical, microtomographic, histological, collagen fiber morphology and RT-qPCR analyses were carried out. The data was submitted to the normality test with a significance level of 5%. The results indicate that *Bauhinia forficata* was able to promote, even partially, a significant improvement in the systemic condition of the T2DBf animals. In the peri-implant biomechanical analysis, it is possible to observe a decrease in removal torque values in T2D:Ti and the use of the phytotherapeutic in T2DBf:Ti promoted a discrete increase in implant removal force; on the other hand, the use of functionalized implants in T2D:vD promoted an increase in implant removal force, similar to the NG:Ti group. In the microtomographic analysis, the use of *Bauhinia forficata* did not lead to differences in the peri-implant bone microarchitecture; however, the use of vD implants improved the parameters evaluated in all the experimental groups. Histological analysis of the peri-implant region showed

reduced bone formation in T2D:Ti, with a reversal of this characteristic with both *Bauhinia forficata* treatment and the use of vD implants, which had a positive impact on collagen fiber morphology. In addition, molecular analysis showed an increase in genes related to the mineralization process with the use of implants functionalized in NG:vD and T2D:vD. Thus, it can be concluded that *Bauhinia forficata* acts in a positive capacity on the etiopathogenesis of type 2 diabetes, as well as improving cellular and tissue responses, although not enough to re-establish the characteristics of peri-implant bone biomechanics. Furthermore, the drug-delivery system with implants functionalized with vitamin D3 was able to reverse, albeit locally, the cellular events involved in bone repair in the type 2 diabetes model, restoring the microstructure and biomechanics of peri-implant bone.

Keywords: diabetes mellitus, type 2; phytotherapeutic drugs; vitamin d; dental implants; animals model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Técnica de incorporação “Dip-Coating”	27
Figura 2 -	Funcionalização das superfícies de titânio com Addera D3® através da técnica de incorporação “Dip-Coating”	28
Figura 3 -	Aplicação de estreptozotocina	34
Figura 4 -	Bauhinia forficata (“Pata-de-vaca”)	35
Figura 5 -	Procedimento de instalação de implantes em tíbia	37
Figura 6 -	Reconstrução tridimensional da região peri-implantar dos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	39
Figura 7 -	Microscopia Eletrônica de Varredura dos discos de titânio funcionalizados com Addera D3® nas concentrações de 40µl e 400µl	43
Figura 8 -	Interação celular sobre as superfícies Ti e vD400µl	48
Figura 9 -	Nódulos de mineralização sobre as superfícies Ti e vD400µl	50
Figura 10 -	Caracterização histológica da região peri-implantar do grupo NG	63
Figura 11 -	Caracterização histológica da região peri-implantar do grupo NGBf	64
Figura 12 -	Caracterização histológica da região peri-implantar do grupo T2D	65
Figura 13 -	Caracterização histológica da região peri-implantar do grupo T2DBf	67
Figura 14 -	Caracterização histológica da região peri-implantar aos 7 dias após a instalação de implantes	68
Figura 15 -	Caracterização histológica da região peri-implantar aos 14 dias após a instalação de implantes	69
Figura 16 -	Caracterização histológica da região peri-implantar aos 28 dias após a instalação de implantes	70

Figura 17 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas no grupo NG	71
Figura 18 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas no grupo NGBf	72
Figura 19 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas no grupo T2D	74
Figura 20 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas no grupo T2DBf	75
Figura 21 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas da região peri-implantar aos 7 dias após a instalação de implantes	76
Figura 22 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas da região peri-implantar aos 14 dias após a instalação de implantes	76
Figura 23 -	Caracterização morfológica das fibras colágenas da região peri-implantar aos 28 dias após a instalação de implantes	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais	32
Tabela 2 -	Dieta de cafeteria	33
Tabela 3 -	Análises propostas	38
Tabela 4 -	Sondas TaqMan para análise de rt-PCR	42
Tabela 5 -	Valores médios de contra-torque obtidos na comparação entre as superfícies Ti, vD40 μ l e vD400 μ l.	46
Tabela 6 -	Valores médios de peso dos animais dos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	51
Tabela 7 -	Valores médios de glicose sanguínea dos animais dos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	52
Tabela 8 -	Valores médios de contra-torque obtidos na análise biomecânica aos 14 dias de reparo peri-implantar	54
Tabela 9 -	Valores médios de contra-torque obtidos na análise biomecânica aos 28 dias de reparo peri-implantar	56
Tabela 10 -	Comparação dos dados de biomecânica óssea peri-implantar óssea entre 14 e 28 dias nos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	58
Tabela 11 -	Área de birrefringência de fibras de colágeno ao longo do processo de reparo peri-implantar	75
Tabela 12 -	Comparação da expressão gênica relativa de Runx2 ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias)	87
Tabela 13 -	Comparação da expressão gênica relativa de ALP ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias)	88
Tabela 14 -	Comparação da expressão gênica relativa de IBSP ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias)	90
Tabela 15 -	Comparação da expressão gênica relativa de OCN ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias)	91

- Tabela 16 - Comparação da expressão gênica relativa de RANK-L ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias) 93
- Tabela 17 - Comparação da expressão gênica relativa de OPG ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias) 94
- Tabela 18 - Comparação da expressão gênica relativa de TRAP ao longo do reparo peri-implantar (14 dias vs. 28 dias) 96

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise microtomográfica da comparação entre as superfícies Ti, vD40µl e vD400µl	44
Gráfico 2 -	Análise de biomecânica óssea peri-implantar na comparação entre as superfícies Ti, vD40µl e vD400µl	46
Gráfico 3 -	Determinação da viabilidade celular aos 3 e 7 dias entre as superfícies Ti e vD400µl	47
Gráfico 4 -	Atividade da fosfatase alcalina aos 3 e 7 dias entre as superfícies Ti e vD400µl	49
Gráfico 5 -	Quantificação de cálcio nas superfícies Ti e vD400µl	50
Gráfico 6 -	Análise de biomecânica óssea aos 14 dias de reparo peri-implantar dos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	54
Gráfico 7 -	Análise de biomecânica óssea aos 28 dias de reparo peri-implantar dos grupos NG, NGBf, T2D e T2DBf	56
Gráfico 8 -	Biomecânica óssea ao longo do processo de reparo peri-implantar	57
Gráfico 9 -	Análise microtomográfica da região peri-implantar aos 28 dias de reparo ósseo	61
Gráfico 10 -	Expressão gênica relativa de Runx2, ALP, IBSP, OCN, OPG, Rank-L e TRAP aos 14 dias de reparo peri-implantar	81
Gráfico 11 -	Expressão gênica relativa de Runx2, ALP, IBSP, OCN, OPG, Rank-L e TRAP aos 28 dias de reparo peri-implantar	85
Gráfico 12 -	Expressão gênica relativa de Runx2 aos 14 e 28 dias do processo de reparo peri-implantar	86
Gráfico 13 -	Expressão gênica relativa de ALP aos 14 e 28 dias do processo de reparo peri-implantar	88
Gráfico 14 -	Expressão gênica relativa de IBSP aos 14 e 28 dias do processo de reparo peri-implantar	89

- Gráfico 15 - Expressão gênica relativa de OCN aos 14 e 28 dias do 91
processo de reparo peri-implantar
- Gráfico 16 - Expressão gênica relativa de RANK-L aos 14 e 28 dias do 92
processo de reparo peri-implantar
- Gráfico 17 - Expressão gênica relativa de OPG aos 14 e 28 dias do 94
processo de reparo peri-implantar
- Gráfico 18 - Expressão gênica relativa de TRAP aos 14 e 28 dias do 95
processo de reparo peri-implantar

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
Bf	<i>Bauhinia forficata</i>
CEUA- FOA	Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba
DMSO	Dimetilsulfóxido
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	Gramas
IBSP	Sialoproteína óssea
LSMT	Laboratório para estudo de tecido mineralizado
mg/dL	Miligramas por decilitros
mg/Kg	Miligramas por quilograma
min	minutos
ml	Mililitros
n	Número
N.cm	Newtons por centímetro
NG	Grupo normoglicêmico
NGBf	Grupo normoglicêmico tratado com <i>Bauhinia forficata</i>
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RANK-L	Ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante
RT-PCR	PCR em tempo real
STZ	Estreptozotocina
T2D	Grupo diabetes tipo 2
T2DBf	Grupo diabetes tipo 2 tratado com <i>Bauhinia forficata</i>
TRAP	Fosfatase ácida tartarato-resistente
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
vD	Vitamina D3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	1ª Etapa – Caracterização das Superfícies	26
3.1.1	Implantes e Discos de Titânio	26
3.1.2	Funcionalização das Superfícies com Vitamina D3	26
3.1.3	Testes Físico-Químicos	29
3.1.4	Cultura de Células Mesenquimais e Análise da Diferenciação Celular	29
3.2	2ª Etapa – Experimentos <i>in vivo</i>	31
3.2.1	Grupos Experimentais	31
3.2.2	Indução do Diabetes Tipo 2	33
3.2.3	Controle Glicêmico e de Peso Corporal	34
3.2.4	Tratamento Fitoterápico com <i>Bauhinia forficata</i>	35
3.2.5	Cirurgia de Instalação dos Implantes	36
3.3	Análises Propostas	37
3.3.1	Análise Biomecânica (Torque de Remoção)	38
3.3.2	Análises dos Tecidos Mineralizados	39
3.3.3	Análises Histotécnicas (Tecido Desmineralizado)	40
3.3.4	Análise Molecular (RT-qPCR)	41
3.4	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	1ª Fase – Caracterização das Superfícies	43
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.1.2	Microtomografia Computadorizada (vD40µl vs. vD400µ)	44
4.1.3	Análise Biomecânica (vD40µl vs. vD400µ)	45
4.1.4	Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	47

4.2 2ª Fase – Testes in vivo	51
4.2.1 Condições Sistêmicas – Dados Clínicos	51
4.2.2 Análise Biomecânica (Torque de Remoção)	52
4.2.3 Análise por Microtomografia Computadorizada	58
4.2.4 Análise Histológica	62
4.2.5 Análise de Morfologia das Fibras Colágenas	70
4.2.6 Análise Molecular (RT-qPCR)	77
5 DISCUSSÃO	97
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO*

O diabetes é uma desordem metabólica provocada pela hiperglicemia crônica no organismo [1], podendo ser classificado como: Diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 (T2D) ou diabetes gestacional [1]. O T2D é a forma mais recorrente da doença, acometendo de 90% a 95% dos pacientes diabéticos, sendo decorrente da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos que resulta na resistência ao hormônio e na incapacidade das células β em compensá-la (disfunção das células β pancreáticas) [1]. Esta síndrome tem como principais fatores etiológicos a presença de uma dieta rica em açúcares, sódio e lipídios associados ao sedentarismo [2], e caracteriza-se pela presença de hiperglicemia crônica, frequentemente, acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial [2-4]. Conseqüentemente, afeta diversos tecidos como rins, nervos, vasos sanguíneos e ossos [5].

O tecido ósseo sofre grande impacto frente ao T2D [6-9], e mesmo não aumentando o risco de fraturas atua em diversas vias do metabolismo deste tecido [6-9]. O colágeno tem uma redução de suas propriedades frente ao T2D devido ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), à formação de cross-links irreversíveis, assim como de espécies reativas de oxigênio (ROS) [7]. Este fato traz conseqüências negativas para a deposição de matriz óssea, interfere na função osteoblástica e aumenta a produção de citocinas inflamatórias e ROS relacionados à reabsorção óssea [6-9]. Estudos apontam que a osteocalcina também possui uma ligação a um receptor em células β (GPCR6A), que quando desregulado por uma dieta com alto teor de gordura e açúcar, resulta em um estímulo de reabsorção óssea [10]. Além disso, os níveis séricos de esclerostina são aumentados em pacientes diabéticos, sugerindo que a via Wnt/ β -catenina de osteócitos também é prejudicada [11].

A cavidade bucal, não diferente dos demais tecidos do organismo, demanda de maiores cuidados em pacientes diabéticos devido à predisposição de doença periodontal, perda óssea, perda de dentes, atraso no processo de reparo alveolar pós-exodôntico e aumenta a taxa de falhas em implantes osseointegráveis [4,12,13]. O

* Revista selecionada para publicação: Plos One - <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

risco de peri-implantite e falhas que levam a perda de implantes vem sendo um assunto muito discutido na odontologia atual, tendo em vista o aumento da quantidade de pacientes diabéticos assim como o aumento de reabilitações com o uso de implantes de titânio. Assim como na doença periodontal, a hiperglicemia causa uma microbiota mais patogênica e aumenta a resposta inflamatória local que acelera ainda mais a perda óssea após instalação de implantes [12].

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, metade dos pacientes com diabetes não são diagnosticados e desta forma não fazem uso de medicações para controlar os efeitos colaterais da doença [1]. A busca por terapias alternativas que podem levar aos resultados positivos sem os efeitos indesejáveis das medicações comerciais, ou ainda, sendo uma alternativa eficaz e de baixo custo que facilitem o acesso ao tratamento para a população, faz com que a indústria fitoquímica ganhe espaço para o tratamento de complicações sistêmicas. Nessa perspectiva, a *Bauhinia forficata Link* (Bf), conhecida como “Pata de vaca”, faz parte do gênero que compreende mais de 300 espécies e quando utilizada na fitopreparação pode contribuir com suas propriedades terapêuticas [14].

A *Bauhinia forficata Link* é uma das 71 plantas selecionadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Bauhinia* revelaram que as principais moléculas do metabolismo secundário incluem flavonoides, terpenoides, glicosídeos esteroidais, lactinas, taninos e quinonas, que garantem a planta seu efeito hipoglicemiante, antidiabético, antioxidante e anti-inflamatório [14-25]. O flavonoide kaempferol (3,7-di-O- α -L-rhamnoside), está diretamente relacionado com os efeitos citados [14,24]. Além disso, é capaz de eliminar radicais livres e regular o ciclo celular pela modulação de alguns caminhos importantes de sinalização celular, como o fator nuclear Kappa-B (NF-kB) [14], que tem relação com a ativação da via OPG/RANK-L, o que sugere à Bf uma possível atuação no tecido ósseo. Um estudo de 2015 [26] obteve resultados positivos da ação do kaempferol no tratamento da osteoporose, pela sua atuação na inativação de osteoclastos e aumentando a proliferação de osteoclastos devido ao aumento da expressão gênica de fosfatase alcalina.

Além da importância do tratamento sistêmico, a associação sinérgica envolvendo terapias locais para a reabilitação com implantes em pacientes diabéticos tem sido pauta para o desenvolvimento de novos estudos. O reparo ósseo frente ao

dano provocado pela exodontia [4] ou ainda pela instalação de implantes [13] requer cuidados locais para auxiliar o processo de reparo, tendo em vista todas as complicações pós operatórias que acometem este tipo de pacientes. A alteração de superfícies de implantes osseointegráveis é um tema que há anos vem sendo atualizado [13,27], seja pelo tipo de material do implante, pela rugosidade criada na superfície de titânio ou ainda pelo uso tópico de medicações [27,28].

A vitamina D ($1\alpha,25$ -diidroxivitamina D), é um hormônio que exerce uma grande variedade de efeitos biológicos na manutenção da homeostase do metabolismo de cálcio e fosfato, quando na sua forma ativa através da pele pela luz UV [29-31]. O uso tópico de vitamina D (vD) na superfície de implantes de titânio possui alguns resultados pré-clínicos que mostram efeitos positivos no reparo peri-implantar [32,33]. A vD possui relação preventiva ao desenvolvimento do T2D [34-36], ou quando instalada a doença, apresenta uma deficiência em seus níveis séricos [37]. Além do mencionado, a vD exerce um papel fundamental na regulação das células do sistema imune (células dendríticas, macrófagos, células T e B), aumentando a expressão de proteínas anti-inflamatórias e diminuindo as pró-inflamatórias [37-42].

Desta forma, pensando-se na associação entre terapias sistêmicas e locais, atuando de forma sinérgica para que os efeitos metabólicos indesejáveis observados no diabetes tipo 2 sejam controlados e pensando nos efeitos obtidos com a ação de biomoléculas que possam controlar a resposta inflamatória local, inerente dos procedimentos cirúrgicos durante a instalação de implantes e que possivelmente estarão exacerbados na condição de diabetes tipo 2, o presente projeto foi concebido. Vale destacar que nosso laboratório tem investigado respostas celulares e teciduais observadas durante o processo de reparo alveolar ou peri-implantar na condição do diabetes tipo 2 e o nosso intuito é buscar por alternativas terapêuticas que possam favorecer os eventos reparacionais observados nesta condição sistêmica.

Assim, num estudo inicial (FAPESP 2016/25747-0), em reparo alveolar de ratos T2D em nosso grupo de pesquisa [4] mostrou que frente ao trauma provocado, o diabetes leva à um atraso no processo de reparo pelo aumento da capacidade inflamatória e pelo prejuízo no metabolismo do colágeno. Este fato nos levou ao desenvolvimento de uma nova linha de trabalhos, desta vez buscando terapias alternativas com medicamentos fitoterápicos assim como terapias locais não invasivas que auxiliassem no processo de reparo peri-implantar (FAPESP 2019/01634-0) [43].

Partindo do princípio de que o T2D e a hiperglicemia aumentam a resposta inflamatória do tecido ósseo, desencadeando uma cascata de eventos não favoráveis ao processo de mineralização e reabsorção, o tratamento de superfícies de implantes com substâncias que possuam um efeito protetor ao tecido ósseo, como a vitamina D, auxiliariam no processo de osseointegração em animais diabéticos tipo 2. Este conjunto de informações levantam questionamentos de como o reparo ósseo peri-implantar se comporta ao longo do processo de osseointegração em animais diabéticos tipo 2.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que o uso sistêmico da *Bauhinia forficata* atua de maneira positiva na etiopatogenia do diabetes tipo 2, além de melhorar as respostas celulares e teciduais, mesmo que de forma não suficiente para restabelecer as características da biomecânica óssea peri-implantar. O sistema de administração baseado em drug-delivery com implantes funcionalizados com vitamina D3 foi capaz de reverter os eventos celulares envolvidos no reparo ósseo do modelo de diabetes tipo 2, restabelecendo a microestrutura e a biomecânica óssea peri-implantar. Ainda, a presença de biomoléculas aplicadas à superfície de titânio proporcionou um processo de formação óssea adequado e eficaz em condição normoglicêmica, podendo ser utilizado com segurança em tanto na presença como na ausência de comprometimentos sistêmicos.

REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.
2. Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2013; 65: 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022>. PMID: 23792771.
3. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav.* 2016; 167: 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>. PMID: 27705750.
4. Pitol-Palin L, Souza Batista FR, Gomes-Ferreira PHS, Mulinari-Santos G, Ervolino E, Souza FÁ, et al. Different stages of alveolar bone repair process are compromised in the type 2 diabetes condition: an experimental study in rats. *Biology.* 2020; 9: 471. <https://doi.org/10.3390/biology9120471>. PMID: 33339217.
5. Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone.* 2016; 82: 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.026>. PMID: 25913633.
6. Hua Y, Bi R, Zhang Y, Xu L, Guo J, Li Y. Different bone sites-specific response to diabetes rat models: Bone density, histology and microarchitecture. *PLoS One.* 2018; 13: e0205503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205503>. PMID: 30346963.
7. Epstein S, Defeudis G, Manfrini S, Napoli N, Pozzilli P; Scientific Committee of the First International Symposium on Diabetes and Bone. Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition. *Osteoporos Int.* 2016; 27: 1931-1951. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3454-x>. PMID: 26980458.
8. Shahen VA, Gerbaix M, Koeppenkastrop S, Lim SF, McFarlane KE, Nguyen ANL, et al. Multifactorial effects of hyperglycaemia, hyperinsulinemia and inflammation on bone remodelling in type 2 diabetes mellitus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020; 55: 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.04.001>. PMID: 32354674

9. Dede AD, Tournis S, Dontas I, Trovas G. Type 2 diabetes mellitus and fracture risk. *Metabolism*. 2014; 63: 1480-1490. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.002>. PMID: 25284729.
10. Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Curr Osteoporos Rep*. 2015; 13: 180-185. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0267-y>. PMID: 25577163,
11. Gaudio A, Privitera F, Pulvirenti I, Canzonieri E, Rapisarda R, Fiore CE. The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (sclerostin and Dickkopf-1) and carotid intima-media thickness in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2014; 11: 48-52. <https://doi.org/10.1177/1479164113510923>. PMID: 24227537.
12. Oliveira PGFP, Bonfante EA, Bergamo ETP, Souza SLS, Riella L, Torroni A, et al. Obesity/metabolic syndrome and diabetes mellitus on peri-implantitis. *Trends Endocrinol Metab*. 2020; 31: 596-610. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.05.005>. PMID: 32591106.
13. King S, Klineberg I, Levinger I, Brennan-Speranza TC. The effect of hyperglycaemia on osseointegration: a review of animal models of diabetes mellitus and titanium implant placement. *Arch Osteoporos*. 2016; 11: 29. <https://doi.org/10.1007/s11657-016-0284-1>. PMID: 27637755.
14. Souza BVC, Moreira Araújo RSDR, Silva OA, Faustino LC, Gonçalves MFB, Santos ML, et al. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2018; 28: 129-138. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1409208>. PMID: 29168921.
15. Pedrete TA, Hauser-Davis RA, Moreira JC. Proteomic characterization of medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Int J Biol Macromol*. 2019; 140: 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.035>. PMID: 31422188.
16. Pinafo MS, Benedetti PR, Gaiotte LB, Costa FG, Schoffen JPF, Fernandes GSA, et al. Effects of *Bauhinia forficata* on glycaemia, lipid profile, hepatic glycogen content and oxidative stress in rats exposed to Bisphenol A. *Toxicol Rep*. 2019; 6: 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.03.001>. PMID: 30911467.

17. Pepato MT, Baviera AM, Vendramini RC, Brunetti IL. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2004; 4: 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-4-7>. PMID: 15186500.
18. Düsman E, Almeida IV, Coelho AC, Balbi TJ, Düsman Tonin LT, Vicentini VE. Antimutagenic effect of medicinal plants *achillea millefolium* and *bauhinia forficata* in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 893050. <https://doi.org/10.1155/2013/893050>. PMID: 24459532.
19. Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81: 191-197. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00075-2). PMID: 12065150.
20. Lubkowski J, Durbin SV, Silva MC, Farnsworth D, Gildersleeve JC, Oliva ML, et al. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth. *FEBS J*. 2017; 284: 429-450. <https://doi.org/10.1111/febs.13989>. PMID: 27973758.
21. Salgueiro AC, Folmer V, Silva MP, Mendez AS, Zemolin AP, Posser T, et al. Effects of *bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 8902954. <https://doi.org/10.1155/2016/8902954>. PMID: 26839634.
22. Cunha AM, Menon S, Menon R, Couto AG, Bürger C, Biavatti MW. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*. 2010; 17: 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.06.007>. PMID: 19577450.
23. Lino CS, Diógenes JP, Pereira BA, Faria RA, Andrade Neto M, Alves RS, et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27: 125-127. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.125>. PMID: 14709915.
24. Souza P, Silva LM, Boeing T, Somensi LB, Cechinel-Zanchett CC, Campos A, et al. Influence of prostanoids in the diuretic and natriuretic effects of extracts and kaempferitrin from *bauhinia forficata* link leaves in rats. *Phytother Res*. 2017; 31: 1521-1528. <https://doi.org/10.1002/ptr.5876>. PMID: 28752576.

25. Franco RR, Mota Alves VH, Ribeiro Zabisky LF, Justino AB, Martins MM, Saraiva AL, et al. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. *Biomed Pharmacother.* 2020; 123: 109798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>. PMID: 31877553.
26. Ma XQ, Han T, Zhang X, Wu JZ, Rahman K, Qin LP, et al. Kaempferitrin prevents bone loss in ovariectomized rats. *Phytomedicine.* 2015; 22: 1159-1162. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.09.003>. PMID: 26598914.
27. Barik A, Chakravorty N. Targeted drug delivery from titanium implants: a review of challenges and approaches. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1251: 1-17. https://doi.org/10.1007/5584_2019_447. PMID: 31768968.
28. Baxter JC, Fattore L. Osteoporosis and osseointegration of implants. *J Prosthodont.* 1993; 2: 120-125. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.1993.tb00393.x>. PMID: 8242165.
29. Bouillon R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* 2017; 13: 466-479. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.31>. PMID: 28387318.
30. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia.* 2005; 48: 1247-1257. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1802-7>. PMID: 15971062.
31. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 2017-2029. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0298>. PMID: 17389701.
32. Satué M, Monjo M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ramis JM. Titanium implants coated with UV-irradiated vitamin D precursor and vitamin E: in vivo performance and coating stability. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28: 424-431. <https://doi.org/10.1111/clr.12815>. PMID: 26926140.
33. Salomó-Coll O, Maté-Sánchez de Val JE, Ramírez-Fernandez MP, Hernández-Alfaro F, Gargallo-Albiol J, Calvo-Guirado JL. Topical applications of vitamin D on implant surface for bone-to-implant contact enhance: a pilot study in dogs part II. *Clin*

Oral Implants Res. 2016; 27: 896-903. <https://doi.org/10.1111/clr.12707>. PMID: 26419393.

34. Lee CJ, Iyer G, Liu Y, Kalyani RR, Bamba N, Ligon CB, et al. The effect of vitamin D supplementation on glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *J Diabetes Complications*. 2017; 31: 1115-1126. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.04.019>. PMID: 28483335.

35. Issa CM. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 996: 193-205. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_16. PMID: 29124701.

36. Lips P, Eekhoff M, van Schoor N, Oosterwerff M, Jongh R, Krul-Poel Y, et al. Vitamin D and type 2 diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 173: 280-285. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.11.021>. PMID: 27932304.

37. Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2014; 43: 205-232. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.010>. PMID: 24582099.

38. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun*. 2017; 85: 78-97. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.07.007>. PMID: 28733125.

39. Guillot X, Semerano L, Saldenbergh-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine*. 2010; 77: 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.09.018>. PMID: 21067953.

40. Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18: 243-258. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9423-2>. PMID: 28409320.

41. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients*. 2012; 4: 52-67. <https://doi.org/10.3390/nu4010052>. PMID: 22347618.

42. Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res*. 2014; 63: 803-819. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0755-z>. PMID: 25048990.

43. Wajima CS, Pitol-Palin L, Souza Batista FR, Santos PH, Matsushita DH, Okamoto R. Morphological and biomechanical characterization of long bones and peri-implant bone repair in type 2 diabetic rats treated with resveratrol. *Sci Rep.* 2024; 14: 2860. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53260-4>.
44. Trino LD, Bronze-Uhle ES, Ramachandran A, Lisboa-Filho PN, Mathew MT, George A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018; 81: 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.02.024>. PMID: 29477893.
45. Hernandez-Montelongo J, Corrales Ureña YR, Machado D, Lancelloti M, Pinheiro MP, Rischka K, et al. Electrostatic immobilization of antimicrobial peptides on polyethylenimine and their antibacterial effect against *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018; 164: 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.002>.
46. Trino LD, Dias LFG, Albano LGS, Bronze-Uhle ES, Rangel EC, Graeff CFO, et al. Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. *Ceram Int.* 2018; 44: 4000-4008. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.11.195>.
47. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Princípios de análise instrumental*. Porto Alegre: Bookman; 2009.
48. Park JW, Kim HK, Kim YJ, Jang JH, Song H, Hanawa T. Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. *Acta Biomater.* 2010; 6: 2843-2851. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.017>. PMID: 20085830.
49. Göttlicher M, Rohnke M, Moryson Y, Thomas J, Sann J, Lode A, et al. Functionalization of Ti-40Nb implant material with strontium by reactive sputtering. *Biomater Res.* 2017; 21: 18. <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0104-8>. PMID: 29046823.
50. Iafisco M, Palazzo B, Falini G, Di Foggia M, Bonora S, Nicolis S, et al. Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate. *Langmuir.* 2008; 24: 4924-4930. <https://doi.org/10.1021/la703381h>. PMID: 18373380.

51. Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol.* 2008; 28: 205-211. <https://doi.org/10.1002/jat.1271>. PMID: 17582586.
52. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process": Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. Available <https://www.fda.gov/media/142959/download>
53. Andrade PD, Vasconcellos LM, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELS, Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: in vitro study. *Mat Sci and Eng C.* 2015; 56: 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.026>.
54. Prado RF, Rabêlo SB, Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VA, Carvalho YR, et al. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26: 259. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5594-0>. PMID: 26449449.
55. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275. PMID: 14907713.
56. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001; 25: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>. PMID: 11846609.
57. Gomes-Ferreira PHS, de Oliveira D, Frigério PB, de Souza Batista FR, Grandfield K, Okamoto R. Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchietomized rats. *Osteoporos Int.* 2020 Sep;31(9):1807-1815. doi: 10.1007/s00198-020-05431-y. Epub 2020 May 7. PMID: 32383065.
58. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 1468-1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>. PMID: 20533309.

59. Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 1254-1264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01747.x>. PMID: 19531103.
60. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979 Jul;11(4):447-55. doi: 10.1007/BF01002772. PMID: 91593.
61. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e20170326. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0326>. PMID: 29898174.
62. Chobot A, Górowska-Kowolik K, Sokołowska M, Jarosz-Chobot P. Obesity and diabetes: not only a simple link between two epidemics. *Diabetes Metab Res Rev.* 2018; 34: e3042. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3042>. PMID: 29931823.
63. Taylor R, Ramachandran A, Yancy WS Jr, Forouhi NG. Nutritional basis of type 2 diabetes remission. *BMJ.* 2021 Jul 7;374:n1449. doi: 10.1136/bmj.n1449. Erratum in: *BMJ.* 2021 Jul 9;374:n1752. doi: 10.1136/bmj.n1752. PMID: 34233884.
64. Taylor R. Understanding the cause of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2024 Sep;12(9):664-673. doi: 10.1016/S2213-8587(24)00157-8. Epub 2024 Jul 19. Erratum in: *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2024 Sep;12(9):e18. doi: 10.1016/S2213-8587(24)00244-4. PMID: 39038473.
65. Damasceno DC, Volpato GT, Calderon Ide M, Aguilar R, Rudge MV. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine.* 2004 Feb;11(2-3):196-201. doi: 10.1078/0944-7113-00348. PMID: 15070172.
66. Menini S, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Pesce CM, Pugliese G. Role of Galectin-3 in Obesity and Impaired Glucose Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9618092. doi: 10.1155/2016/9618092. Epub 2015 Dec 6. PMID: 26770660.
67. Chávez-Bustos EA, Morales-González A, Anguiano-Robledo L, Madrigal-Santillán EO, Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, Mendoza-Pérez JA, Fregoso-Aguilar TA. *Bauhinia forficata* Link, Antioxidant, Genoprotective, and Hypoglycemic Activity in a

Murine Model. *Plants (Basel)*. 2022 Nov 11;11(22):3052. doi: 10.3390/plants11223052. PMID: 36432781

68. Gasparini P, Garofolo IC, Telles MM, Oyama LM, Veneza VM, Moura Veiga TA, Flor Silveira VL, Caperuto LC. Bauhinia forficata link extract attenuates insulin resistance by preserving glucose uptake in gastrocnemius muscle. *Nat Prod Res*. 2023 Jun;37(12):2031-2036. doi: 10.1080/14786419.2022.2113875. Epub 2022 Aug 23. PMID: 35997243.

69. Wagner J, Spille JH, Wiltfang J, Naujokat H. Systematic review on diabetes mellitus and dental implants: an update. *Int J Implant Dent*. 2022 Jan 3;8(1):1. doi: 10.1186/s40729-021-00399-8. PMID: 34978649.

70. D'Ambrosio F, Amato A, Chiacchio A, Sisalli L, Giordano F. Do Systemic Diseases and Medications Influence Dental Implant Osseointegration and Dental Implant Health? An Umbrella Review. *Dent J (Basel)*. 2023 Jun 5;11(6):146. doi: 10.3390/dj11060146. PMID: 37366669

71. Enteghad S, Shirban F, Nikbakht MH, Bagherniya M, Sahebkar A. Relationship Between Diabetes Mellitus and Periodontal/Peri-Implant Disease: A Contemporaneous Review. *Int Dent J*. 2024 Jun;74(3):426-445. doi: 10.1016/j.identj.2024.03.010. Epub 2024 Apr 12. PMID: 38614881.

72. Baniulyte G, Ali K. How does diabetes mellitus impact on the prognosis of dental implants? *Evid Based Dent*. 2023 Sep;24(3):114-115. doi: 10.1038/s41432-023-00909-0. Epub 2023 Aug 10. PMID: 37563223

73. Selvaraj V, Sekaran S, Dhanasekaran A, Warriar S. Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation*. 2024 Mar-Apr;136:100757. doi: 10.1016/j.diff.2024.100757. Epub 2024 Feb 28. PMID: 38437764.

74. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):307-15. doi: 10.1007/s00223-012-9678-2. Epub 2012 Dec 16. PMID: 23241924; PMCID: PMC3726565.

75. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020 Sep 10;9(9):2073. doi: 10.3390/cells9092073. PMID: 32927921; PMCID: PMC7564526.
76. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2016 Dec;8(6):225-235. doi: 10.1177/1759720X16670154. Epub 2016 Oct 5. PMID: 28255336.
77. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5. doi: 10.1210/endo.142.12.8536
78. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 2000;21(10):495-502. doi: 10.1016/s0167-5699(00)01718-7.
79. Bonucci E. Bone mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17(1):100-28. doi: 10.2741/3918. PMID: 22201735.
80. Kitagawa IL, Miyazaki CM, Pitol-Palin L, Okamoto R, de Vasconcellos LMR, Constantino CJL, Lisboa-Filho PN. Titanium-Based Alloy Surface Modification with TiO₂ and Poly(sodium 4-styrenesulfonate) Multilayers for Dental Implants. *ACS Appl Bio Mater*. 2021 Apr 19;4(4):3055-3066. doi: 10.1021/acsabm.0c01348.
81. Sivaswamy V, Bahl V. Surface Modifications of Commercial Dental Implant Systems: An Overview. *J Long Term Eff Med Implants*. 2023;33(2):71-77. doi: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.2022042612.
82. Suh MS, Kastellorizios M, Tipnis N, Zou Y, Wang Y, Choi S, Burgess DJ. Effect of implant formation on drug release kinetics of in situ forming implants. *Int J Pharm*. 2021 Jan 5;592:120105. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120105.
83. Shirazi S, Huang CC, Kang M, Lu Y, Leung KS, Pitol-Palin L, Gomes-Ferreira PHS, Okamoto R, Ravindran S, Cooper LF. Evaluation of nanoscale versus hybrid micro/nano surface topographies for endosseous implants. *Acta Biomater*. 2024 Jan 1;173:199-216. doi: 10.1016/j.actbio.2023.10.030.

84. Sinjab K, Sawant S, Ou A, Fenno JC, Wang HL, Kumar P. Impact of surface characteristics on the peri-implant microbiome in health and disease. *J Periodontol*. 2024 Mar;95(3):244-255. doi: 10.1002/JPER.23-0205.
85. Khalil MI, Sakr H. Implant Surface Topography Following Different Laser Treatments: An In Vitro Study. *Cureus*. 2023 May 8;15(5):e38731. doi: 10.7759/cureus.38731.
86. Kunrath MF, Garaicoa-Pazmino C, Giraldo-Osorno PM, Haj Mustafa A, Dahlin C, Larsson L, Asa'ad F. Implant surface modifications and their impact on osseointegration and peri-implant diseases through epigenetic changes: A scoping review. *J Periodontal Res*. 2024 May 15. doi: 10.1111/jre.13273.
87. Heng PWS. Controlled release drug delivery systems. *Pharm Dev Technol*. 2018 Nov;23(9):833. doi: 10.1080/10837450.2018.1534376.
88. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-49. doi: 10.2147/ijn.s596.
89. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Feb;20(2):101-124. doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
90. Farnoud AM. Nano-bio interactions in drug delivery. *Phys Biol*. 2020 Jul 29;17(5):050201. doi: 10.1088/1478-3975/aba63b.
91. Farzan M, Roth R, Schoelkopf J, Huwyler J, Puchkov M. The processes behind drug loading and release in porous drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2023 Aug;189:133-151. doi: 10.1016/j.ejpb.2023.05.019.
92. Kawahara T, Okada Y, Tanaka Y. Vitamin D efficacy in type 1 and type 2 diabetes. *J Bone Miner Metab*. 2024 Jul;42(4):438-446. doi: 10.1007/s00774-024-01509-3. Epub 2024 Apr 25. PMID: 38664254.
93. Pujari SP, Scheres L, Marcelis AT, Zuilhof H. Covalent surface modification of oxide surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014 Jun 16;53(25):6322-56. doi: 10.1002/anie.201306709. Epub 2014 May 21. PMID: 24849332.
94. Gargalionis AN, Adamopoulos C, Vottis CT, Papavassiliou AG, Basdra EK. Runx2 and Polycystins in Bone Mechanotransduction: Challenges for Therapeutic

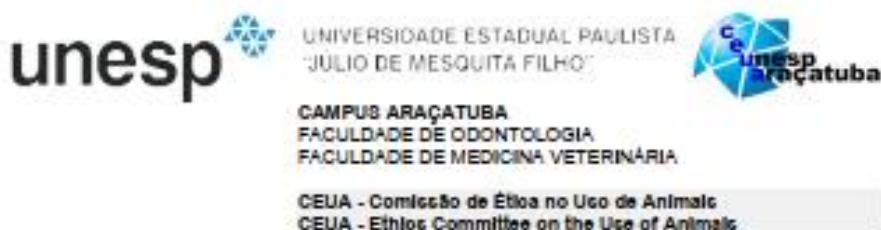
Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2024 May 13;25(10):5291. doi: 10.3390/ijms25105291. PMID: 38791330.

95. Romano F, Serpico D, Cantelli M, Di Sarno A, Dalia C, Arianna R, Lavorgna M, Colao A, Di Somma C. Osteoporosis and dermatoporosis: a review on the role of vitamin D. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Aug 24;14:1231580. doi: 10.3389/fendo.2023.1231580. PMID: 37693364

96. Gomes-Ferreira PHS, Frigério PB, de Moura J, Duarte ND, de Oliveira D, Deering J, Grandfield K, Okamoto R. Evaluation of Vitamin D isolated or Associated with Teriparatide in Peri-Implant Bone Repair in Tibia of Orchiectomized Rats. *Biology (Basel).* 2023 Jan 31;12(2):228. doi: 10.3390/biology12020228. PMID: 36829506.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº 00129-2021)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa Intitulado "Efeito da *Bauhinia forficata* sistêmica e de biomoléculas aplicadas à superfície de Implantes de titânio sobre a dinâmica óssea perimplantar de ratos diabéticos tipo 2: um estudo translacional", Processo FOA nº 0129-2021, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 24 de Julho de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 24 de Agosto de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of systemic *Bauhinia forficata* and biomolecules applied to titanium implant surfaces on perimplant bone dynamics of type 2 diabetic rats: a translational study", Protocol FOA nº 0129-2021, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 24, 2025.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 24, 2025.



Prof. Associado João Carlos Callera
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo



*Periódico de Escolha: **Plos One***

Impact Factor: PLOS does not consider Impact Factor to be a reliable or useful metric to assess the performance of individual articles.

Endereço Eletrônico: <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>