



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Pós Graduação em Odontologia - Mestrado

Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Bruna Junger

Efeitos da ativação do PPAR-gama no reparo ósseo e na osseointegração de implantes dentários

ARAÇATUBA - SP

2020

Bruna Junger

Efeitos da ativação do PPAR-gama no reparo ósseo e na osseointegração de implantes dentários

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Jr.
Coorientadora: Prof Dra. Vanessa Souza-Mello

ARAÇATUBA - SP
2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

J95e	Junger, Bruna. Efeitos da ativação do PPAR gama no reparo ósseo e na ósseointegração de implantes dentários / Bruna Junger. – Araçatuba, 2020 67 f. : il. ; Tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior Coorientadora: Profa. Vanessa Souza-Mello 1. Osso e ossos – Metabolismo 2. PPAR gama 3. Implantes dentários I. T. Black D7 CDD 617.6
------	---

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico esse trabalho, inicialmente ao maior orientador da minha vida, que não me abandonou nos momentos de necessidade e sem sua direção e inteligência infinita, a conclusão deste trabalho não seria possível. A **Deus** toda honra, toda glória e todo louvor.

A seguir dedico àqueles que, por meio de sua capacidade produtiva, mulheres e homens inovadores através de seu trabalho árduo e honesto constantemente criaram e subverteram limites, sonharam e realizaram para que pudéssemos criar novas tecnologias e armazenar conhecimento nas mais diversas áreas.

Agradeço e dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais. Esta dissertação é a prova de que o investimento e dedicação valeram a pena.

Agradecimientos

Agradeço imensamente ao meu orientador **Prof. Dr Idelmo Rangel Garcia Jr.** pela postura impecável que manteve diante das adversidades que se apresentavam e cuja dedicação e paciência serviram de pilar de sustentação para conclusão deste trabalho. Grata por tudo.

Quero agradecer à **Profa. Dra. Vanessa Souza-Mello** por ter sido um verdadeiro farol durante minha navegação nas águas turvas do tema deste projeto e por ser uma constante fonte de motivação e incentivo ao longo desses anos. Por me orientar tanto na vida como na academia. Uma professora exemplar e uma pesquisadora impressionante. Seu coração enorme me permitiu desenvolver o amor pela pesquisa e pela docência no início da graduação, e suas aulas hoje fazem uma diferença enorme dentro da minha prática clínica. Grata pela sua orientação preciosa.

À **Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto** e à **Profa Dra Roberta Okamoto** , por compartilharem seus conhecimentos e auxiliarem no desenvolvimento deste trabalho. Ambas foram fundamentais para a realização desta pesquisa. Muito obrigada pelo tempo e pelo carinho dedicados.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza** que por tantas vezes compartilhou momentos e guiou plantões com maestria. Sempre quebrando minha solidão no prédio 5 para contar suas histórias, fez com que vários momentos se tornassem mais leves e menos estressantes.

Ao **Prof. Dr. André Luís da Silva Fabris** e à **Profa. Dra. Sabrina Ferreira** por todo incentivo e por serem excelentes preceptores. É precioso demais aprender com vocês a cada dia.

Aos demais professores das disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, **Oswaldo, Alessandra, Ana Paula, Daniela, Leonardo** agradeço pela dedicação com os alunos e por mostrarem com tanto zelo os caminhos da docência superior.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação **Thiago Machado, Melyna Almeida, Ana Flávia Piquera, Juceléia** e aos alunos de iniciação científica **Yasmin, Isabela e Vitor Hugo**, que tanto me ajudaram em um período conturbado do mestrado, obrigada por cuidarem dos animais no momento em que precisei me ausentar, e obrigada por terem despendido tempo e esforço para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos demais colegas e amigos da pós-graduação **André, Gabriel, Kim, Carol, Isa, Laís, Luiza, Cássio, Bruno, Henrique, Breno, Yasmin, Luan, Ramez, Edith, Rodrigo** obrigada por compartilharem momentos e experiências comigo e por todos os momentos que tivemos.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira** e **Fausto Canuto**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner** e **Paulo Gratão**, sou muito grata por vocês terem me ensinado sobre os processamento laboratoriais,

pelo apoio e aconselhamento durante esse tempo que convivemos.

Ao **João Correa, Arnaldo e Camilo Venâncio** por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

À todos os funcionários da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, UNIMED – Araçatuba e UNIMED - Birigui**

Aos **pacientes** atendidos por confiarem suas vidas e permitirem novos aprendizados para que pudéssemos cada vez mais implementar técnicas que trouxessem benefício ao maior número de pessoas possível.

Aos **animais** que serviram ao propósito como modelo de estudo e permitem que novas tecnologias sejam aplicadas em prol do desenvolvimento da ciência e da sociedade.

Ao apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)** que permitiu a conclusão desta pesquisa

À **Implalife** por fornecer o implante utilizado neste trabalho.

Epígrafe

"Tudo é tão cansativo que não há como descrever. Não importa quanto vemos, nunca ficamos satisfeitos; Não importa quanto ouvimos, nunca nos contentamos"

Eclesiastes 1:8 NVT

Junger, B. Efeitos da ativação do PPAR-gama no reparo ósseo e na osseointegração de implantes dentários.

RESUMO

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma de isoforma gama (PPAR-gama) são fatores de transcrição que se encontram no entrelaçamento de várias vias metabólicas e determinam a gênese da obesidade e doenças associadas. Estudos recentes têm relatado o potencial dos medicamentos agonistas PPARs, usados no tratamento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, de afetar a função das células ósseas e o risco de fratura. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ativação do PPAR-gama no processo de reparo ósseo e osseointegração de implantes dentários. Foram utilizados 42 ratos Wistar alimentados com ração sólida padrão para roedores e água “ad Libitum”. A administração do agonista PPAR-gama (durante 4 semanas) foi realizada incorporada à dieta perfazendo dois grupos experimentais: Grupo Controle (SC) e Grupo PPAR-gama (SC-gama). Os animais, em seguida, foram submetidos a procedimento cirúrgico para instalação de implantes dentários e confecção de defeitos ósseos nas tíbias direita e esquerda, respectivamente. Após períodos de 7, 15 e 45 dias os animais foram eutanasiados e as tíbias removidas seguiram para processamento e posterior análise histológica descritiva e histomorfometria. Em relação aos defeitos, no aspecto histológico descritivo, em todos os períodos analisados, há atraso no reparo ósseo do grupo SC-gama em relação ao SC. A histomorfometria apresenta diferença comparando os grupos teste e controle nos parâmetros ossoneoformado (ON) em 7 dias ($P=0,0374$) e 15 dias ($P=0,0134$) e osso maduro (OM) em 15 dias ($P=0,0009$). Em 45 dias, os valores tanto de OM quanto de ON não apresentam significância. Já as tíbias onde o implante foi instalado, nas áreas de roscas os dois grupos apresentam-se muito semelhantes tanto aos eventos celulares quanto à maturação óssea exceto no período de 15 dias onde o grupo teste apresentou atraso no reparo peri-implantar. Conclui-se que, em relação ao reparo ósseo o processo de diferenciação e remodelação é lento no grupo tratado; e em relação ao reparo peri-implantar o comportamento biológico demonstra atraso do grupo tratado apenas no período intermediário.

Palavras chave: 1. Osso e ossos – Metabolismo 2. PPAR gama 3. Implantes dentários

Junger, B Descriptive analysis of the effects of PPAR-gamma activation on bone repair and osseointegration of dental implants.

ABSTRACT

The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma isoform (PPAR-gamma) are transcription factors found in the interlacing of several metabolic pathways that determine the genesis of obesity and associated diseases. Recent studies have reported the potential of PPAR agonist drugs, used to treat cardiovascular disease and type 2 diabetes, to affect bone cell function and fracture risk. This study aimed to evaluate the effects of PPAR-gamma activation on the process of bone repair and osseointegration of dental implants. Thirty-six Wistar rats received standard rodent solid chow and "ad Libitum" water. The administration of the PPAR-gamma agonist (during four weeks) was performed incorporated into the diet, making two experimental groups: Control Group (SC) and PPAR gamma Group (SC-gama). The animals were then submitted to a surgical procedure to install dental implants and make bone defects in the right and left tibias, respectively. After periods of 7, 15, and 45 days the animals were euthanized, the tibiae were removed for histological protocols and subsequent descriptive histological analysis and histomorphometry. Concerning the defects, the descriptive histological aspect revealed a slight delay in bone repair in the SC-gamma group in comparison with the SC for all parameters. Conversely, the histomorphometry showed difference between the groups regarding neoformed bone (NB) in 7 days ($P = 0.0374$) and 15 days ($P = 0.0134$) and mature bone (MB) in 15 days ($P = 0.0009$). At 45 days, there were no differences between the groups regarding MB and NB. As for tibiae, where the implant was placed, the two groups were similar to both cellular events and bone maturation in the areas of threads, except at 15 days where the test group showed delay in peri-implant repair.

In conclusion, regarding the bone defect, the process of differentiation and remodeling is slow in the treated group. Regarding the implant, a descriptive histological analysis showed biological behavior delay in the treated group only in the intermediate period.

Keywords: 1. Bone metabolism 2. PPARs 3. Dental implants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Power Test	28
Figura 2 – Delineamento experimental dos grupos de estudo	29
Figura 3 – Procedimento cirúrgico	32
Figura 4 – Reparo Ósseo. SC 7 dias	34
Figura 5 – Reparo Ósseo. SC 15 dias	35
Figura 6 – Reparo Ósseo. SC 45 dias	36
Figura 7 – Reparo Ósseo. SC-gama 7 dias	37
Figura 8 – Reparo Ósseo. SC-gama 15 dias	38
Figura 9 – Reparo Ósseo. SC-gama 45 dias	39
Figura 10 – Reparo Ósseo. SC 45 dias x SC-gama 45 dias	40
Figura 11 – Reparo Peri-Implantar. SC 7 dias	41
Figura 12 – Reparo Peri-Implantar. SC15 dias	42
Figura 13 – Reparo Peri-Implantar. SC 45 dias	43
Figura 14 – Reparo Peri-Implantar. SC-gama 7 dias	44
Figura 15– Reparo Peri-Implantar. SC-gama 15 dias	45
Figura 16– Reparo Peri-Implantar. SC-gama 45 dias	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Tecido Conjuntivo. SC x SC-gama em 7, 15 e 45 dias	48
Gráfico 2 – Osso Neoformado. SC x SC-gama em 7,15 e 45 dias	49
Gráfico 3 – Osso Maduro. SC x SC-gama em 7,15 e 45 dias	50
Gráfico 4 – Outros tecidos. SC x SC-gama em 7,15 e 45 dias	51
Gráfico 5 – Massa corporal inicial (g)	52
Gráfico 6 – Massa corporal final (g)	52
Gráfico 7 – Glicemia em Jejum (mg/dL)	53
Gráfico 8 – Teste Intraperitoneal de Tolerância à glicose – TITG (mg/min)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Estatísticas Descritivas</i> . OM - 45 dias e ON - 15dias	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

TAB – Tecido Adiposo Branco	26
IL – Interleucina	26
TNF – Fator de Necrose Tumoral	26
RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$	26
OPG – Osteoprotegerina	26
PPARs – Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomas	26
PPAR-gama – Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomas de isoforma gama	26
TZD – Tiazolidinedionas	26
SC – Grupo controle (Solid chow - dieta padrão para roedores)	28
SC-gama – Grupo teste (dieta padrão para roedores + agonista PPAR-gama)	28
PVP-I – Polivinil Pirrolidona Iodo	30
HE – Hematoxilina e Eosina	33
EDTA – Ácido Etileno Tetra-acético	33
MN – leucócitos mononucleares	34
PMN – leucócitos polimorfonucleares	34
OM – Osso maduro	47
ON – Osso Neoformado	47
TC – Tecido Conjuntivo	47
OU – Outros tecidos (células inflamatórias, vasos sanguíneos e heritrócitos)	47

SUMÁRIO

1. Introdução	24
2. Objetivos	27
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Delineamento experimental	27
3.2 Procedimento cirúrgico	30
3.3 Eutanásia e Coleta do Material	33
3.4 Preparo das Peças	33
4. Resultados	33
4.1 Análise Histológica Descritiva	33
4.1.1 Reparo Ósseo	33
4.1.2 Reparo Peri-implantar	41
4.2 Planejamento Estatístico	47
4.2.1 Análise Histomorfométrica	47
4.2.2 Massa Corporal	52
4.2.3 Glicemia e TITG	53
5. Discussão	54
6. Conclusão	59
7. Referências	60
8. Anexo A	63
9. Anexo B	64

1. Introdução

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado altamente especializado em constante dinâmica aposicional, onde, a quantidade/qualidade óssea resulta da neoformação e reabsorção realizadas pelas células que o compõe: osteoblastos e osteoclastos, respectivamente [1, 2]. A migração das células envolvidas neste processo é um evento importante e que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas [2]. Frente aos demais ossos do corpo, a maxila e a mandíbula possuem maior taxa de remodelação, principalmente quando da ausência de elementos dentários [3, 4]. Sendo um processo fisiológico altamente sensível qualquer desarranjo dentro da dinâmica de aposição óssea, além de acarretar prejuízos, pode comprometer a reabilitação do paciente [2, 5]. Ao considerar-se a realidade brasileira, um significativo número de perdas dentárias precoces promove a exodontia a um dos procedimentos mais realizados na clínica odontológica, sendo de fundamental importância que se busquem soluções para as demandas da população [6-8].

Desde a pré-história o ser humano busca por formas de reabilitar dentes perdidos, a utilização de lascas de material calcário, utilização de dentes de pessoas mortas, dentes esculpidos em madeira, foram alguns dos artifícios utilizados através de gerações em diversas civilizações. Como por exemplo, povos pré-colombianos, chineses e egípcios [9, 10].

A odontologia moderna nos trouxe durante o transcorrer do século XX novos materiais que permitiram a reposição de dentes perdidos nas mais diversas possibilidades e necessidades individuais dos pacientes atendidos diariamente nas clínicas odontológicas espalhadas pelo mundo. A implantodontia teve um papel de destaque no que tange à reabilitação de pacientes com perdas dentárias parciais e até mesmo com pacientes inválidos orais, onde o edentulismo total se configurava [9, 11].

Os implantes justa ósseos/subperiosteais, implantes agulhados de Scialon e implantes de Formiggini tiveram papel inicial, ainda que em uma implantodontia rudimentar onde os conceitos

desenvolvidos por PI Branemark ainda não faziam parte do dia a dia clínico em odontologia [9]. O grande número de falhas aliado ao encapsulamento fibroso dos implantes levou com que os mesmos fossem substituídos pelos implantes osseointegráveis desenvolvidos por Branemark após a descoberta da osseointegração [11, 12].

A osseointegração é o fenômeno resultante da integração morfofuncional entre osso e implante sem a justaposição de tecido conjuntivo fibroso na interface osso-implante [12, 13]. Tal fenômeno é resultante da interação dos fenômenos envolvidos no reparo ósseo em contato com a superfície do implante, essa superfície possui uma camada de óxido de titânio, tornando a superfície passiva e evitando, desta forma, a troca de íons entre o leito do alvéolo cirúrgico e o metal [13-15].

Assim como a osseointegração, o reparo ósseo e sua modulação são fatores importantes dentro da pesquisa médico-odontológica [13]. Diversas formas de se modular o reparo e a neoformação óssea são diariamente investigadas em diversos grupos de pesquisa e centros de referência. Contudo, o custo biológico proveniente desta modulação pode acarretar intercorrências, como exostoses e osteomas [16, 17]. Os limites para tal modulação ainda carecem de dados realmente assertivos acerca de suas possibilidades, mantendo, desta forma, o reparo ósseo como um grande tema para diversas pesquisas, tanto em odontologia como em medicina.

Afecções como obesidade, hipertensão, e diabetes podem vir a interferir com os processos de reparo tecidual, levando à dificuldades clínicas que impactam diretamente no sucesso clínico dos tratamentos propostos aos pacientes [18-20], podendo influir não apenas em questões estritamente clínicas odontológicas, bem como, psicológicas, autoestima, qualidade de vida etc [21-23].

A obesidade acomete o metabolismo de diversos órgãos sendo uma condição deletéria também para o metabolismo ósseo [24]. A inflamação subsequente à lipotoxicidade pode ser

responsável pela perda óssea [25], bem como o aumento de gordura na medula óssea [26], pode favorecer a diferenciação e ativação osteoclástica [27]. O tecido adiposo branco (TAB) do obeso produz citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , as quais estimulam a proliferação e diferenciação de osteoclastos [28]. Osteoblastos produzem o ligante do receptor ativador do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), dois fatores críticos na diferenciação osteoclástica [29]. Com isso, a obesidade aumenta a osteoclastogênese e reduz a formação osteoblástica, afetando a homeostase óssea de uma maneira geral em favor da reabsorção óssea [19]. Assim a osteoclastogênese está relacionada com a osteoblastogênese e a adipogênese. Estratégias para conter o avanço da obesidade e das doenças associadas são pertinentes e urgentes no mundo atual, onde as doenças crônicas não-transmissíveis dominam as taxas de mortalidade e os gastos dos sistemas de saúde mundialmente.

Nesse contexto, surgem os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs – isoformas alfa, beta e gama) que são fatores de transcrição que se encontram no entrelaçamento de várias vias metabólicas que determinam a gênese da obesidade e doenças associadas. A ativação dos PPARs emergiu como um alvo potencial para o controle da obesidade e suas comorbidades, uma vez que promove a transcrição de genes que codificam proteínas importantes para a regulação da oxidação lipídica, diferenciação dos adipócitos, desacoplamento de energia mitocondrial, gasto energético, metabolismo ósseo e diferenciação celular óssea [30, 31].

As tiazolidinedionas (TZD) formam um grupo de medicamentos agonistas seletivos do PPAR-gama comumente utilizados no tratamento da diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares [32]. Essas medicações como a pioglitazona reduzem os níveis de glicose no plasma, melhorando a capacidade de resposta de células a ação da insulina. Ademais, estudos recentes têm relatado o potencial das TZDs de afetar a função das células ósseas e risco de fratura [33, 34].

Patel et al 2014 em prévio estudo *invitro* avaliou os efeitos diretos dos agonistas PPAR-gama

e alfa em relação as funções de osteoblastos e osteoclastos primários. Tendo sido observada uma desregulação dos principais marcadores osteogênicos em ambas as culturas tratadas com agonistas PPAR enquanto houve aumento de 40-70% de gotículas lipídicas. Em relação às culturas tratadas com agonista PPAR-gama, a formação de estruturas ósseas por osteoblastos calvares de ratos foi reduzida de 45% a 85% dependendo do agonista PPAR-gama selecionado (rosiglitazona e troglitazona, respectivamente). Em cultura derivada de medula óssea de camundongos em relação à formação de osteoclastos, com o uso das duas drogas, foi reduzido a atividade reabsortiva sem afetar o número de osteoclastos. Desta maneira, sugerindo que os agonistas PPAR gama podem aumentar a perda óssea através do aumento da adipogênese em detrimento da formação de osteoblastos [35].

2. Objetivo

Avaliar os efeitos da ativação do PPAR gama no processo de reparo ósseo e osseointegração de implantes dentários em tíbias de ratos a partir de análises qualitativas e quantitativas dos achados histológicos.

3. Materiais e métodos

3.1. Delineamento Experimental

O número amostral foi determinado pelo cálculo do poder da amostra ("Power Test") por meio do website: http://www.lee.dante.br/cgi-bin/uncgi/calculo_amostra. Assim, fundamentados nos resultados publicados por Nyan et al., 2014 para o poder do teste a 0,8, com alfa a 5%, com a diferença da media na ordem de 20 , com desvio padrao de 15.6, ficou estabelecido um numero de 7 animais por grupo e tempo experimental [77].

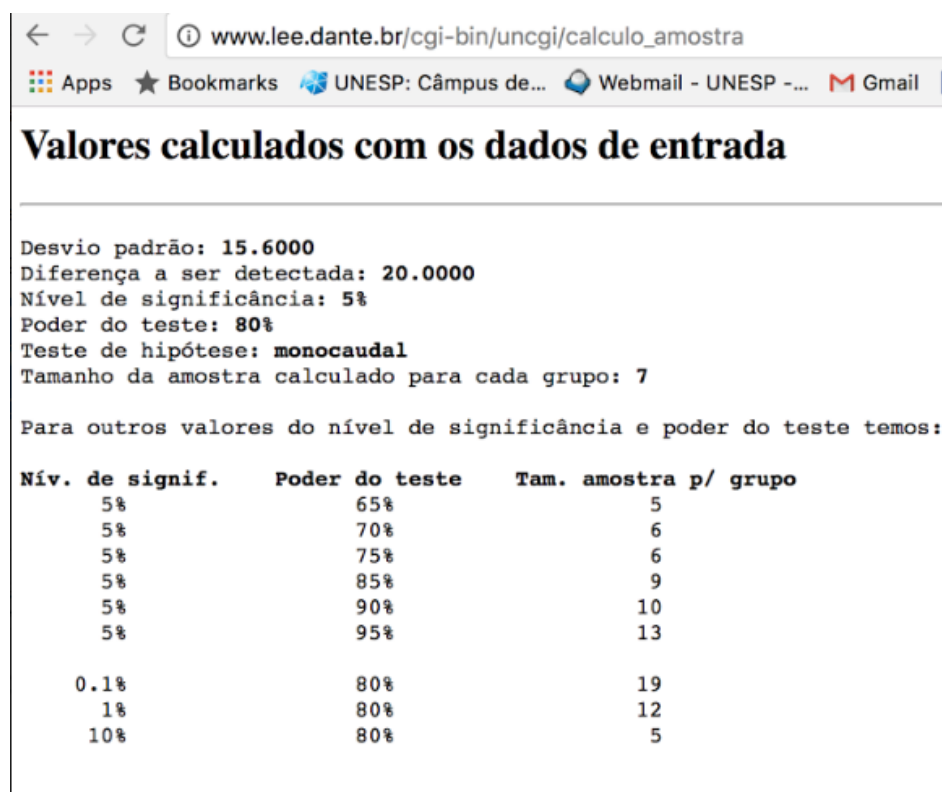


Figura 1: Cálculo do poder da amostra ("Power Test").

Foram utilizados 42 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, adultos (3 meses de idade), com aproximadamente 200g a 300g. Os animais foram pareados no início do estudo de maneira a diminuir o desvio padrão. Os mesmos foram pesados e os dados da massa corporal foram tabulados.

Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas com cinco animais cada, em ambiente climatizado, alimentados com ração sólida padrão para roedores e água “*ad Libitum*”. A administração da medicação foi realizada incorporada à dieta, perfazendo dois grupos experimentais:

- Grupo Controle (SC): dieta padrão ao longo de todo o experimento
- Grupo PPAR gama (SC-gama): dieta padrão associada ao agonista PPAR Gama

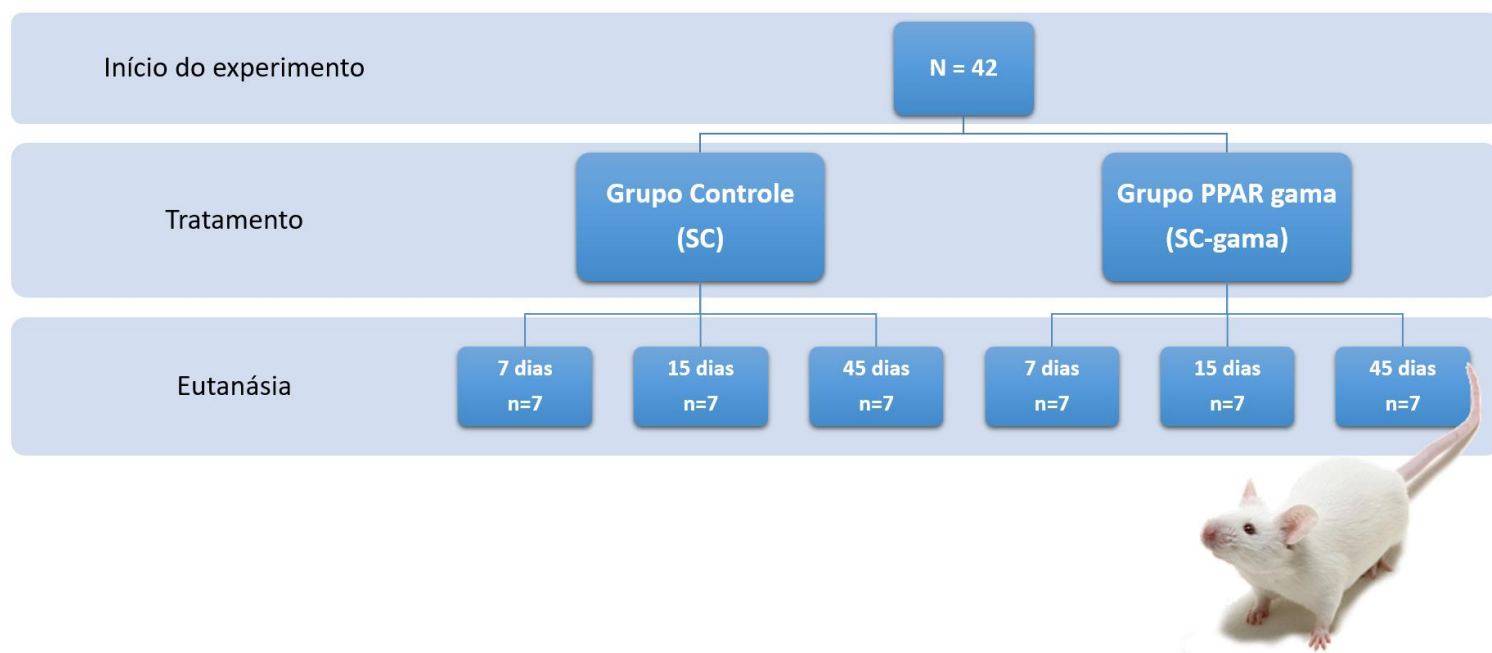


Figura 2: Delineamento experimental dos grupos do estudo.

Os animais (n=7/período) tiveram livre acesso à água e ração. Foi administrada a pioglitazona na dose de 10 mg/kg/dia, incorporado à dieta do grupo SC-gama [36]. Ao final das 4 semanas de tratamento com o agonista, foi realizado o Teste Intrapenitoneal de Tolerância à Glicose (TITG) [37], onde a glicemia foi mensurada com glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) após seis horas de jejum (tempo 0) e nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após aplicação de solução glicosada (1g glicose/kg massa corporal). A seguir, os animais passaram por procedimento cirúrgico e sofreram eutanásia nos tempos de 7, 15 e 45 dias [36]. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido à Comissão de ética no Uso de Animais da FOA- UNESP de acordo com o PROCESSO ARAC/FO 923/2018. (ANEXO A).

3.2. Procedimento Cirúrgico

Inicialmente, os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 12 horas. A anestesia foi realizada por administração intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50mg/Kg, e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na metáfise tibial.

A tíbia foi acessada após prévia tricotomia da região lateral direita e esquerda e antisepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto). Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas estéreis.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), uma incisão linear por planos anatômicos de 1 cm foi feita na região lateral da metáfise tibial. A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição da porção lateral da metáfase tibial.

Após exposição do tecido ósseo, foi realizada osteotomia bi-cortical com fresa lança de 2 mm de diâmetro montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil), que por sua vez foi conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Cada animal recebeu 1 implante de titânio com travamento e estabilidade inicial, cada um

de 1,6 mm de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil), na metáfise tibial direita.

Na tíbia esquerda de cada animal foi confeccionado defeito ósseo obtido por meio da utilização de fresa lança de 2 mm de diâmetro externo (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil).

Finalizada a instalação do implante, o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos. O plano muscular foi suturado por pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo, a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). Todos os animais foram operados pela mesma equipe composta por cirurgiões calibrados.

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1UI, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica (1mg/kg, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

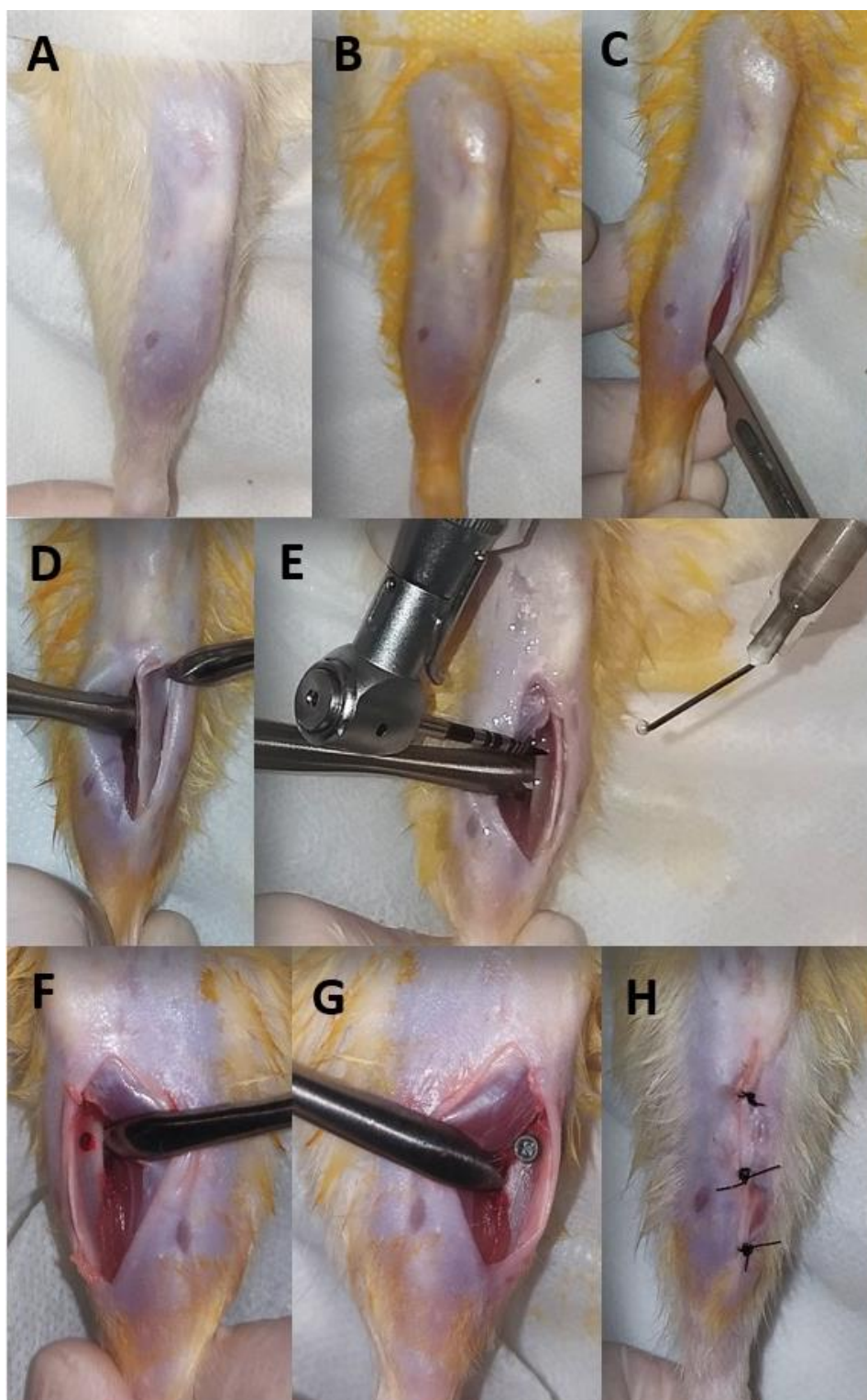


Figura 3: Procedimento cirúrgico : A- Tricotomia; B- Degermação com PVPI; C- Acesso Cirúrgico; D- Descolamento de tecidos; E- Osteotomia com copiosa irrigação; F- Defeito ósseo preenchido por coágulo; G- Implante instalado; H – Sutura por pontos simples interrompidos. Fonte: A autora, 2020.

3.3 Eutanásia e Coleta do Material

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 15 e 45 dias e ocorreu por dose intramuscular excessiva de anestésico (Tiopental 150 mg/Kg e bloqueio com Lidocaína 10 mg/kg) para a remoção das tíbias do animal com margem de 1 cm de tecido ósseo do implante e do defeito ósseo.

3.4 Preparo das peças

Imediatamente após a eutanásia, as peças ósseas foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP-Brasil) por 24 horas. Após esse período, essas peças sofreram descalcificação em EDTA 20% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil), com trocas semanais da solução por um período de 4 a 6 semanas. Já descalcificadas, as peças foram desidratadas utilizando uma sequência de álcoois 70, 80, 90, 95, 100I, 100II, 100III e álcool/xilol (1:1) com trocas de hora em hora. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada 1 hora e 45 minutos para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montagem em lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc., Nova Jersey, EUA) e as mais representativas foram separadas para realização da análise descritiva.

4. Resultados

4.1 Análise Histológica Descritiva

4.1.1 Reparo Ósseo

SC 7 dias : Observa-se região de reparo ósseo preenchido por delicada rede de fibrina permeada por leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) tipo neutrófilos e hemácias. As paredes do defeito ósseo apresentam focos de degeneração, bem como lacunas vazias de osteócitos. Periféricamente, tem-se fragmentos soltos de tecido ósseo, possivelmente decorrentes do processo de fresagem do mesmo. O periósteo encontra-se ausente. Por outro lado, em alguns cortes tem-se atividade osteogênica importante, com deposição de matriz óssea e presença de trabéculas neoformadas em meio a tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos.

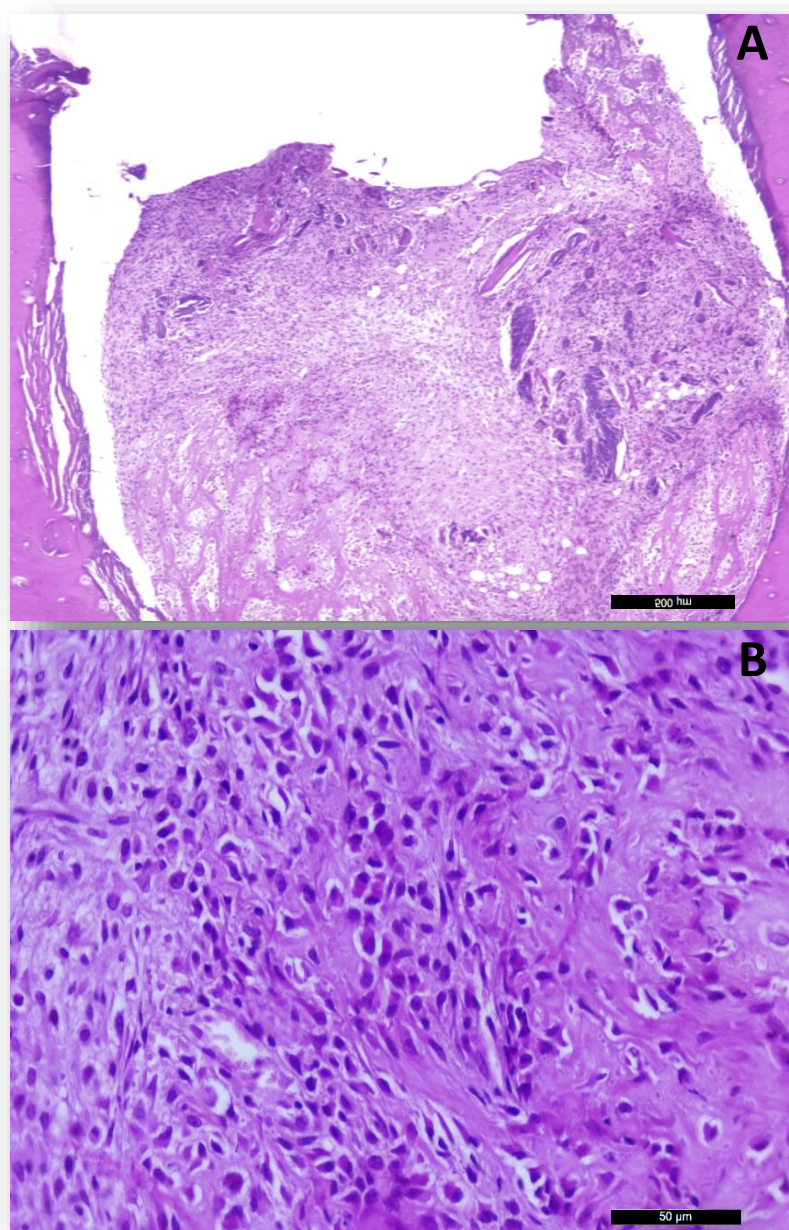


Figura 4: Reparo Ósseo– SC 7 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) e aumento de 40x (B).
Fonte: A autora, 2020.

SC 15 dias: Neste período, observa-se maturação das trabéculas ósseas associadas a discreta atividade osteoclástica. Em sua maioria, apresentam morfologia regular, porém, com numerosos osteócitos. Permeando as trabéculas, nota-se medula óssea predominantemente constituída por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizada e apresentando leucócitos MN. Adjacente ao defeito, na superfície da cortical óssea, observa-se presença de calo ósseo, constituído ora por tecido ósseo, ora por tecido de aspecto condrogênico. Ainda é possível observar-se nitidamente a linha de fresagem do osso, além da presença do tecido conjuntivo periosteal delimitando a região em reparação.

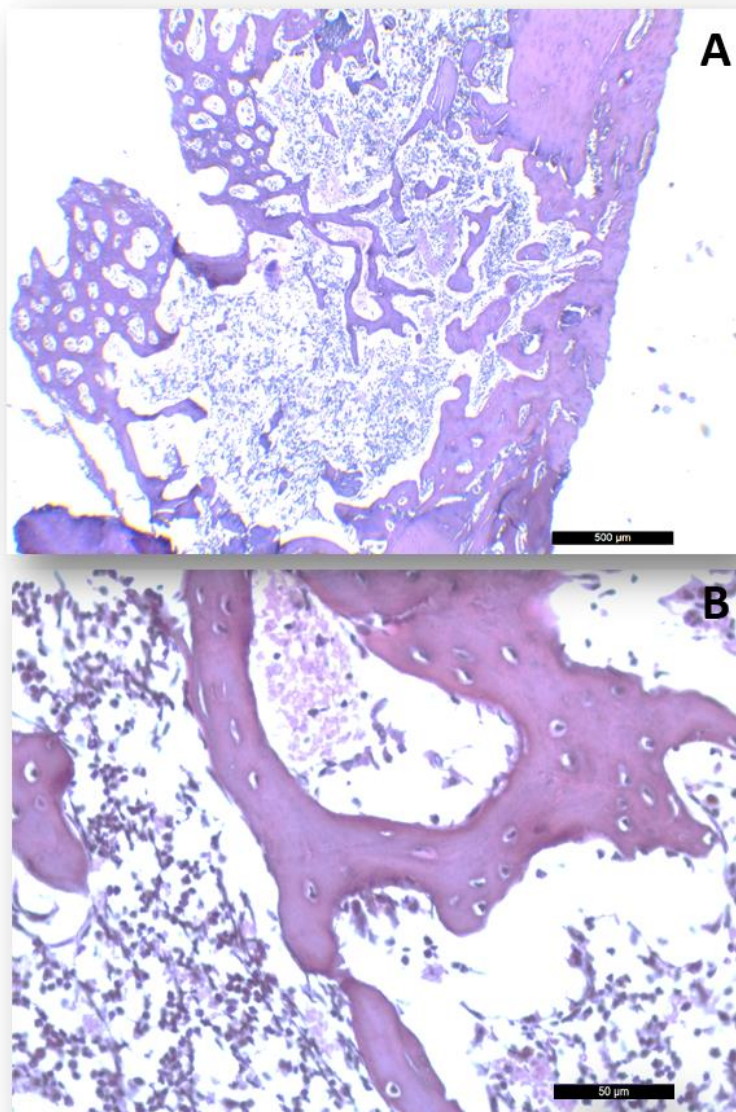


Figura 5: Reparo Ósseo.SC 15 dias.Fotomicrografia em aumento de 5x (A) e aumento de 40x (B).

Fonte: A autora, 2020.

SC 45 dias: Neste período, observa-se a reconstituição parcial da cortical óssea por tecido em remodelação, constituído ilhas de condrócitos entremeando tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo. Ainda é possível visualizar a superfície de corte, com discreta faixa de osso degenerado.

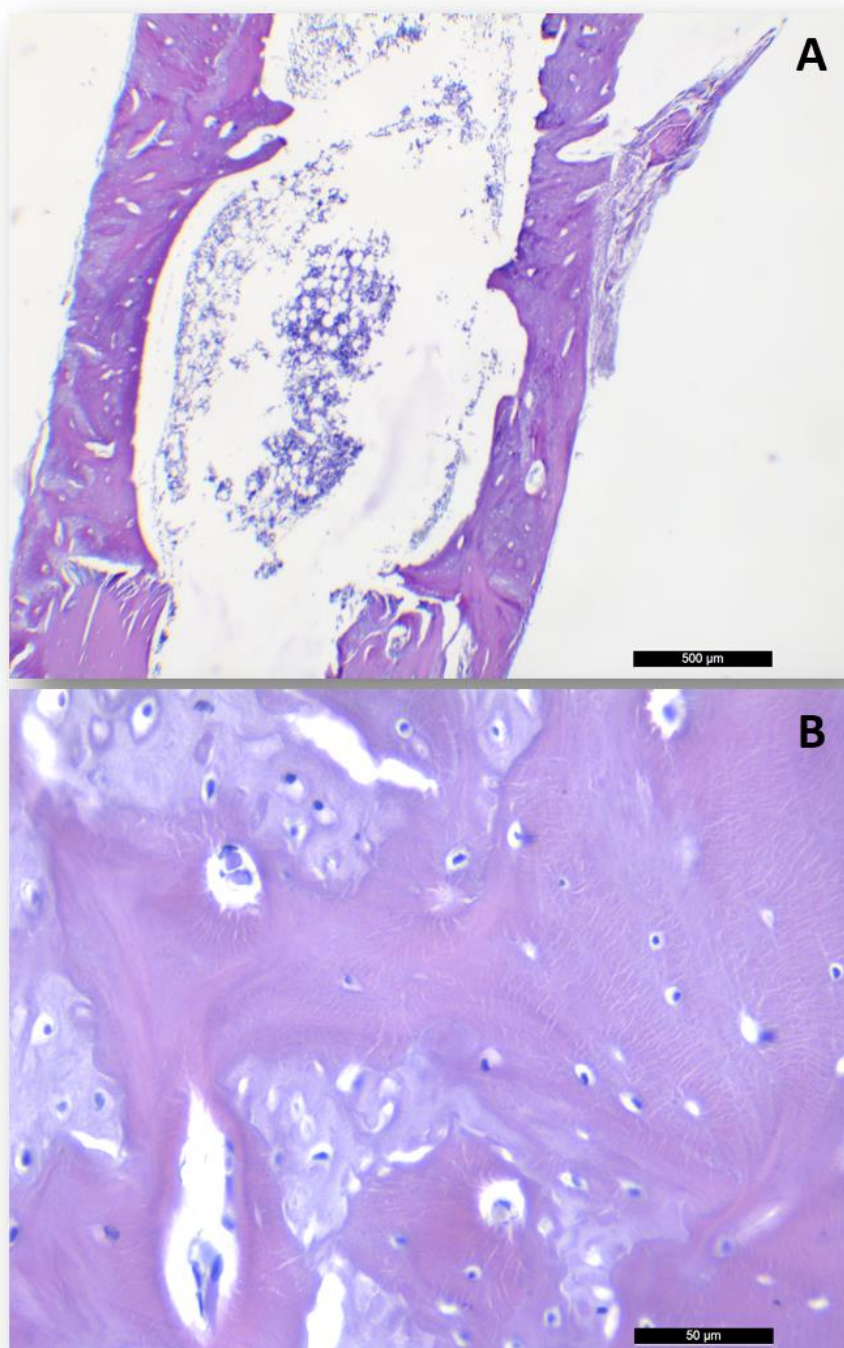


Figura 6: Reparo Ósseo – SC 45 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) e aumento de 40x (B). Fonte: A autora, 2020.

SC-gama 7 dias : Nota-se reparo ósseo preenchido por tecido conjuntivo osteogênico, ricamente celularizado, apresentando neoformação óssea com deposição de matriz irregular. De permeio, tem-se uma presença significativa de leucócitos PMN e MN. A área de ostectomia é nítida, com discreta camada de tecido ósseo degenerado.

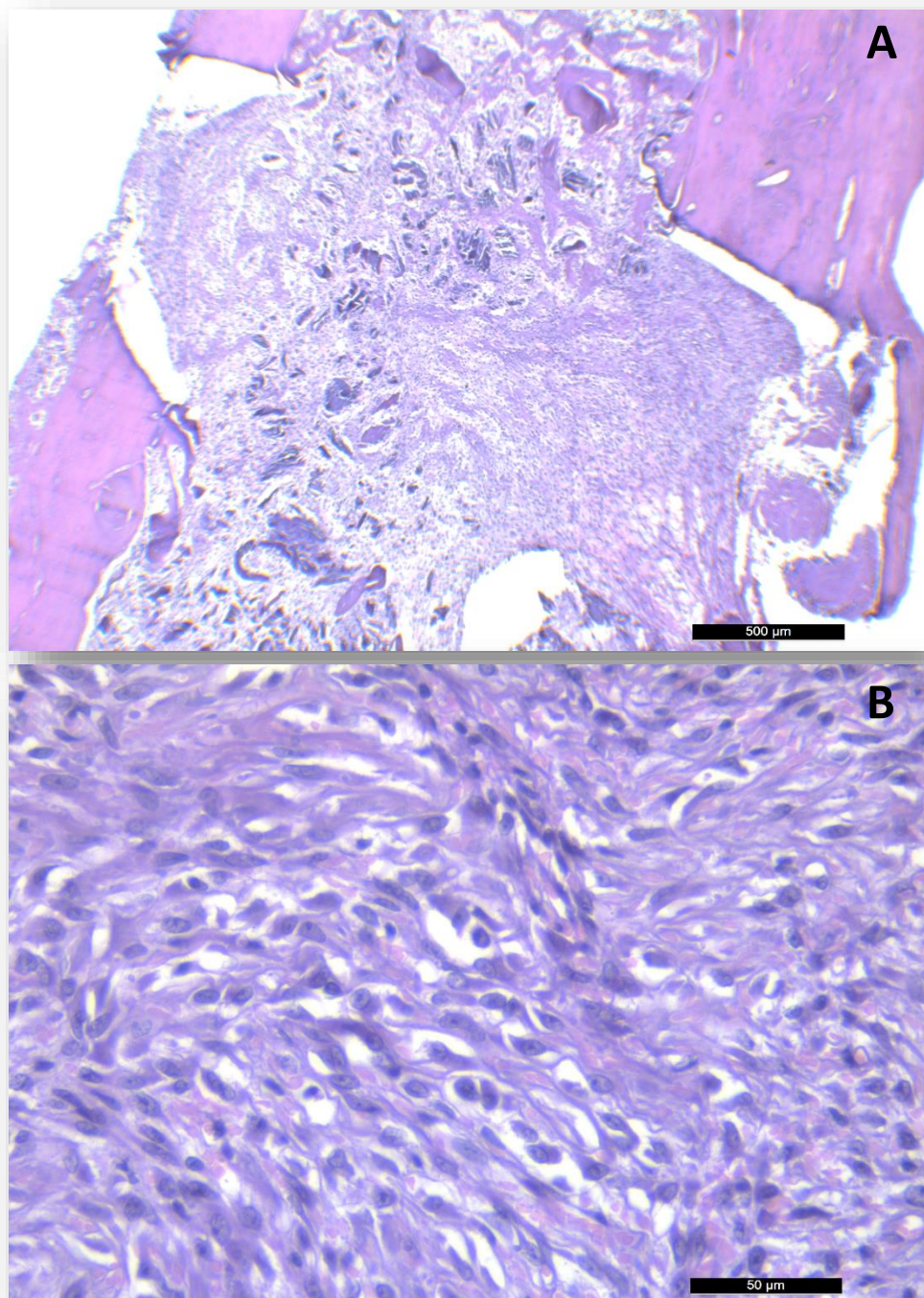


Figura 7: Reparo Ósseo – SC-gama 7 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) e aumento de 40x (B). Fonte: A autora, 2020.

SC-gama 15 dias: Observa-se defeito bicortical preenchido por tecido conjuntivo frouxo com densos feixes de fibra colágena, eventualmente apresentando áreas com atividade osteogênica. Notam-se numerosos vasos sanguíneos e foco de moderado infiltrado inflamatório mononuclear.

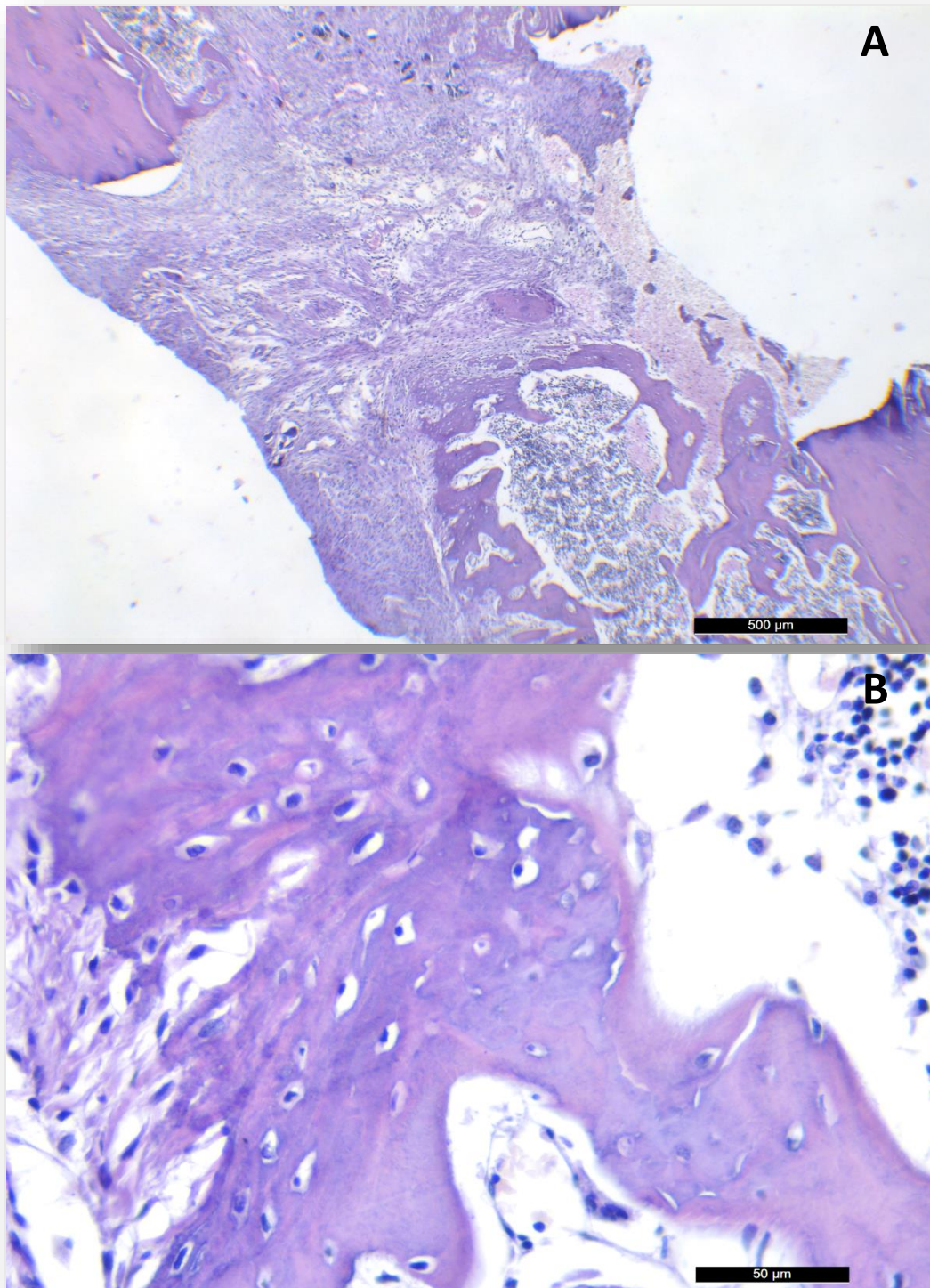


Figura 8: Reparo Ósseo – SC-gama 15 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) e aumento de 40x (B). Fonte: A autora, 2020.

SC-gama 45 dias: Observa-se a reconstituição parcial da cortical óssea por tecido em remodelação, constituído ilhas de condrócitos entremeando tecido ósseo neoformado e matriz colágena.

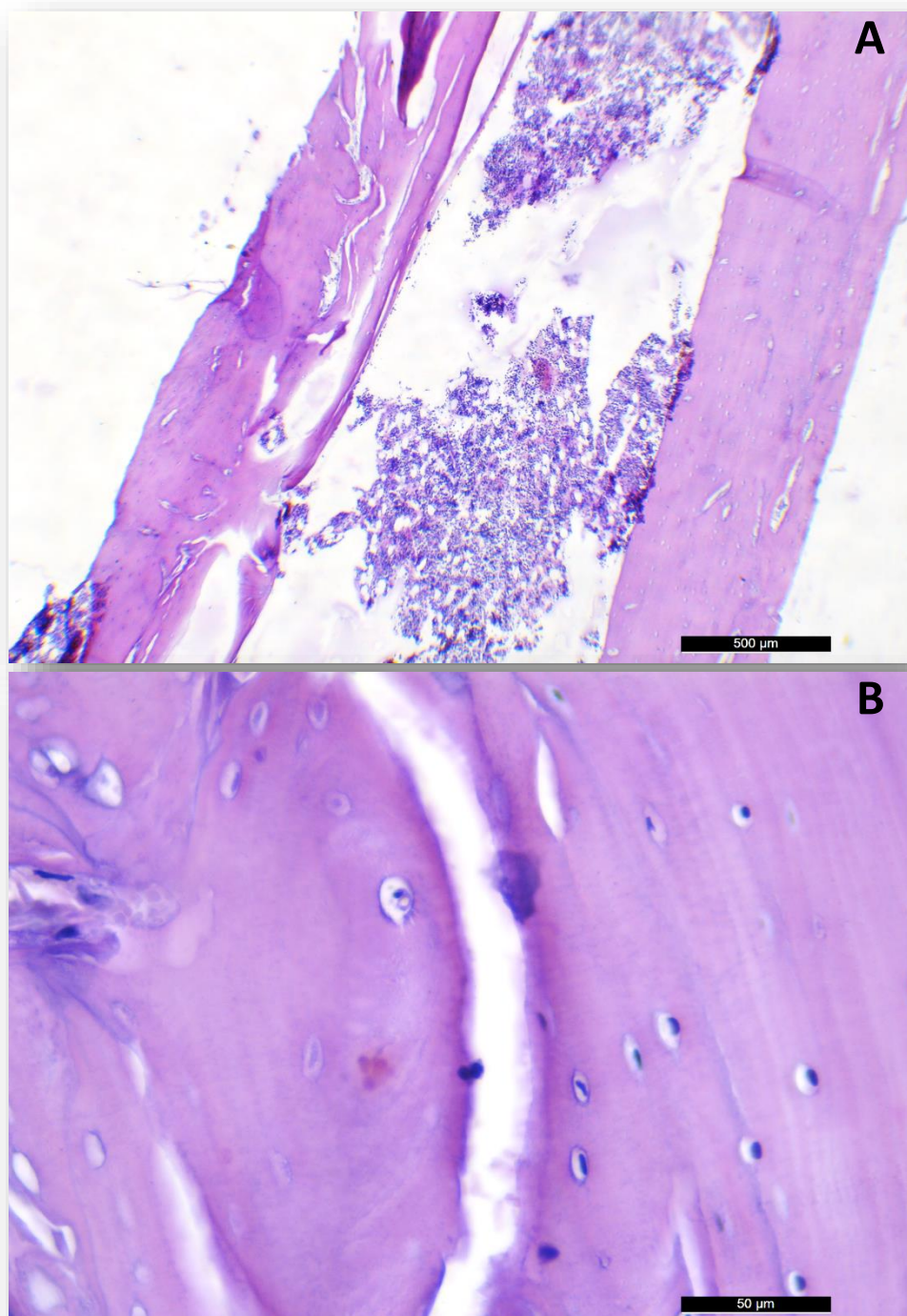


Figura 9: Reparo Ósseo – SC-gama 45 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) e aumento de 40x (B). Fonte: A autora, 2020.

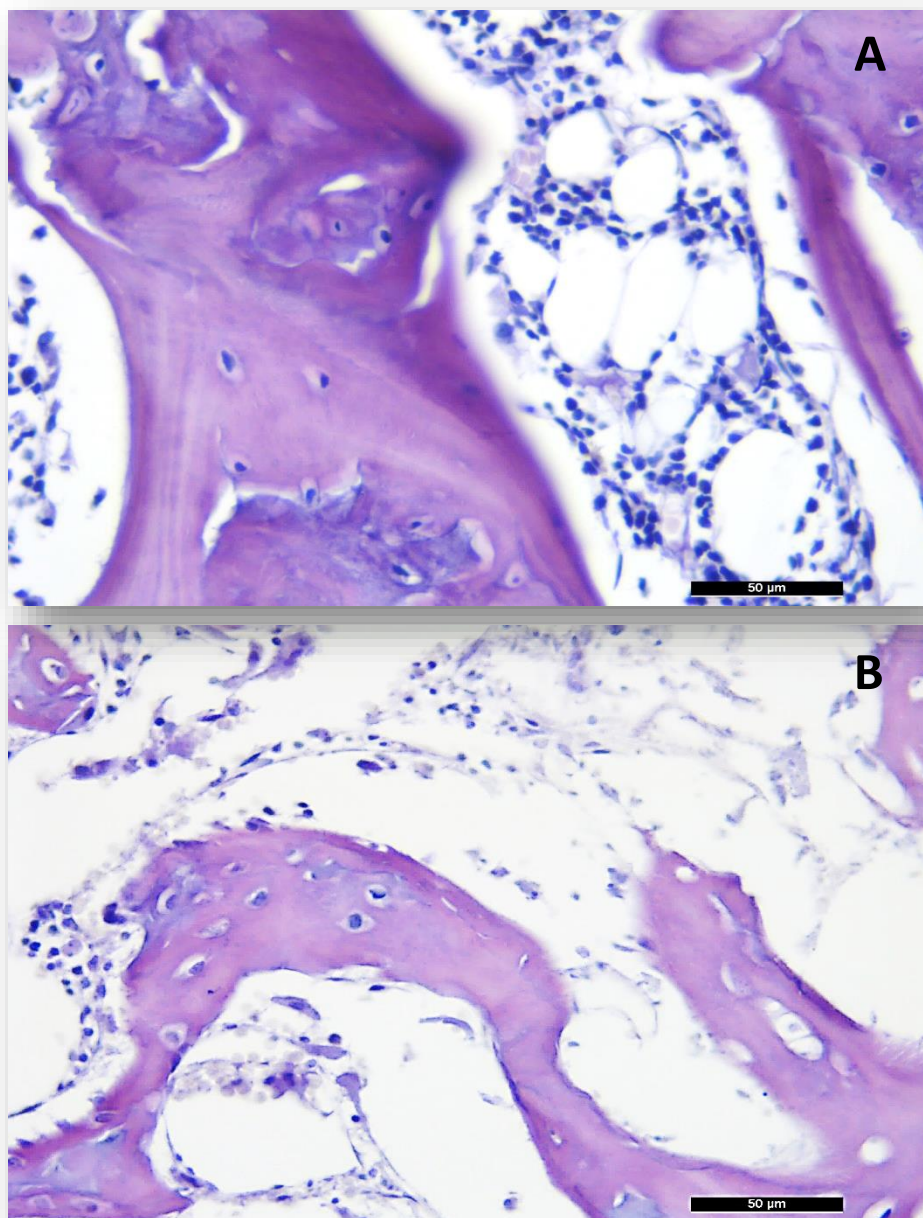


Figura 10: Reparo Ósseo : A- SC 45 dias, B - SC-gama 45 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x. Fonte: A autora, 2020.

Na região medular é possível notar trabéculas maiores e adipócitos maiores além de um processo de reparo ósseo evoluído no grupo controle trabéculas maiores, osso medular maior, adipócitos menores. No grupo gama encontramos o oposto, adipócitos mais maduros e trabéculas menores, e intensa atividade osteoclástica (Figura 10).

4.1.2 Reparo Peri-implantar

Grupo Controle 7 dias: Em contato com a superfície do implante, tanto na região cortical como medular da tíbia tem-se tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, discretamente infiltrado por leucócitos mononucleares. Mais próximo da superfície, observa-se atividade osteogênica com deposição de matriz óssea. Em continuidade, já notam-se trabéculas neoformadas em meio a fragmentos de tecido ósseo possivelmente resultantes da fresagem.

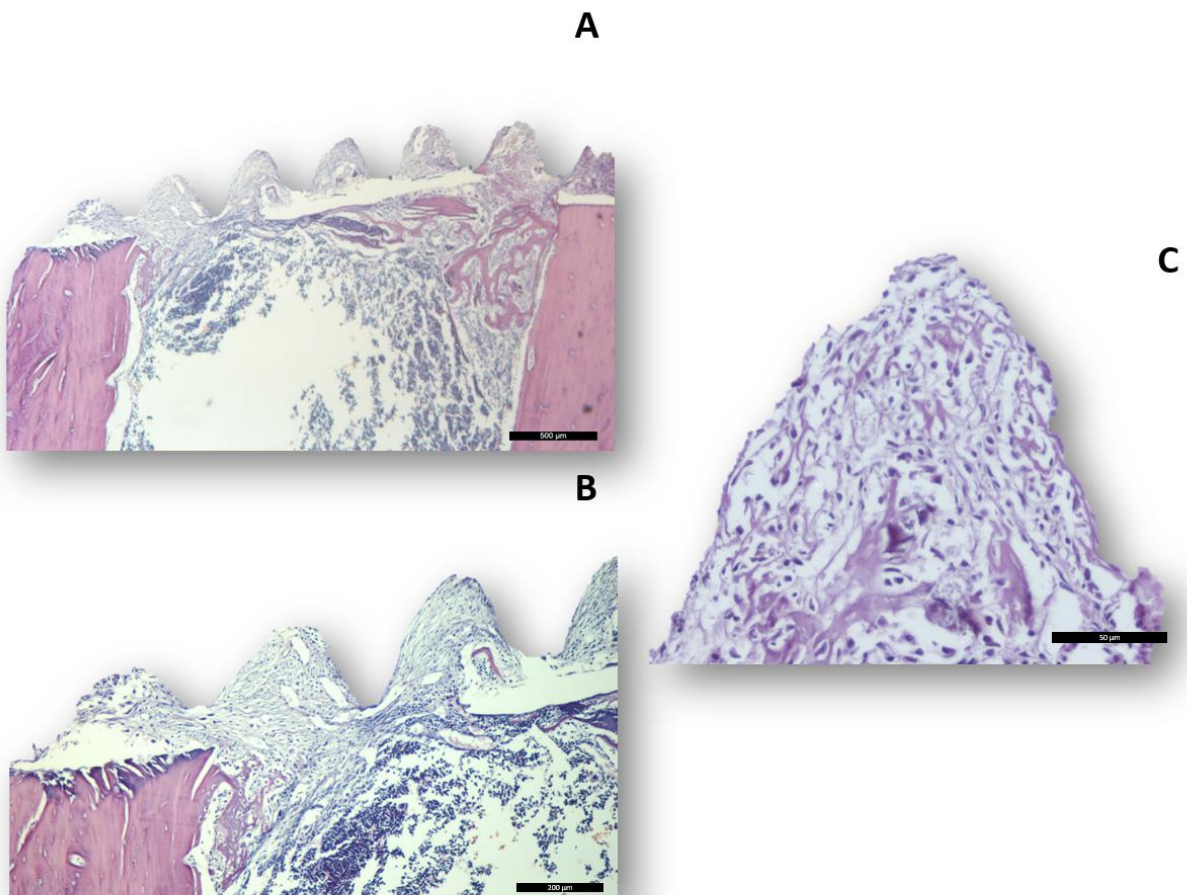


Figura 11: Reparo Peri-implantar– SC 7 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

Grupo Controle 15 dias: Neste período, nota-se ora tecido conjuntivo frouxo em contato com a superfície do implante, ora delicada camada de tecido ósseo em maturação em meio a medula óssea hematopoiética.

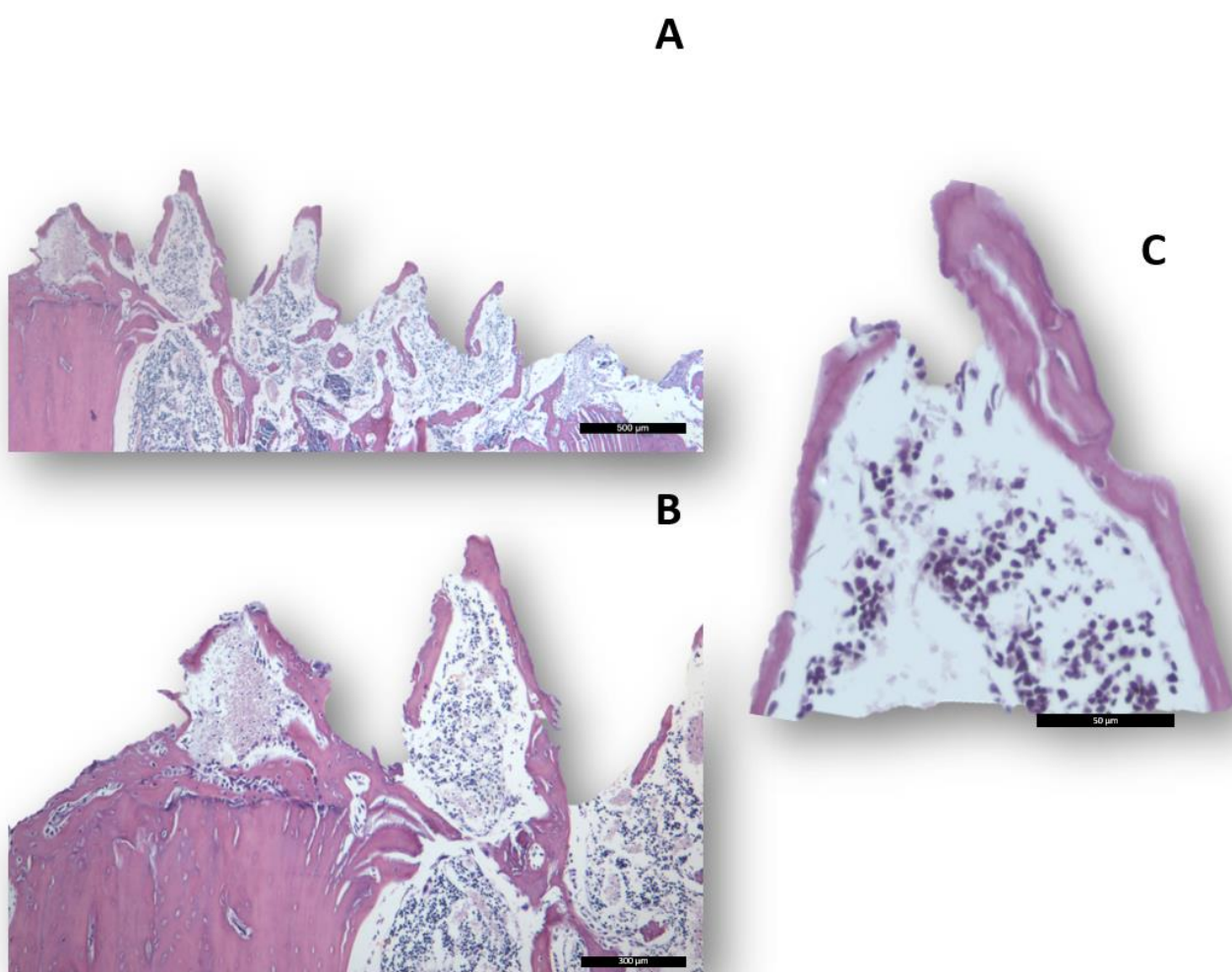


Figura 12: Reparo Peri-implantar – SC 15 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

Grupo Controle 45 dias: Em contato com a superfície do implante tem-se a presença de tecido ósseo maduro em franca remodelação, marcado por evidentes linhas de reversão. Notam-se lacunas com osteócitos e espaços medulares organizados.

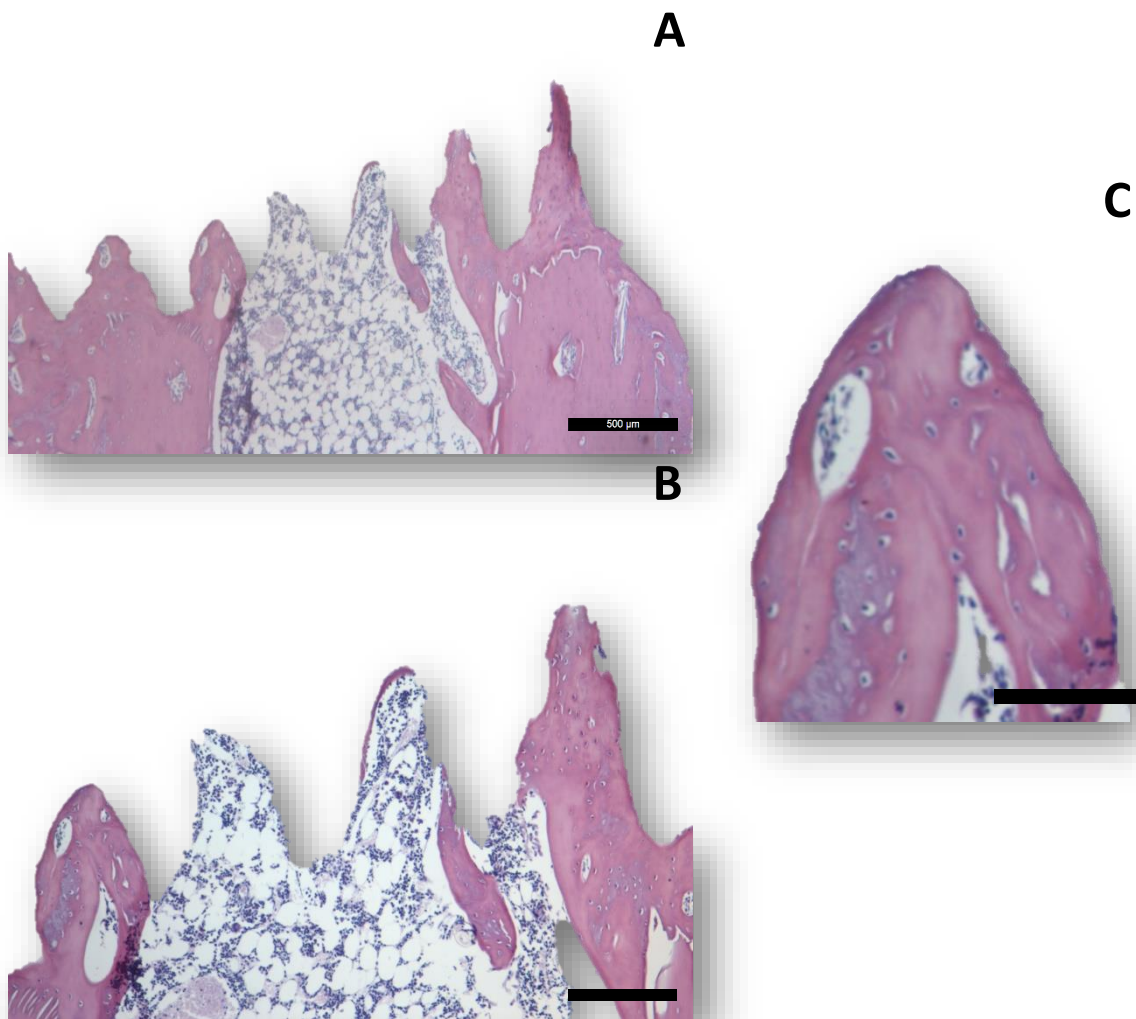


Figura 13: Reparo Peri-implantar – SC 45 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

Grupo PPAR GAMA 7 dias : Em contato com a superfície do implante, observa-se tecido conjuntivo frouxo, moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares, apresenta ilhas de neoformação óssea adjacente à cortical óssea, inferiormente ao periósteo. Adjacente, notam-se numerosas espículas ósseas em meio a tecido de granulação.

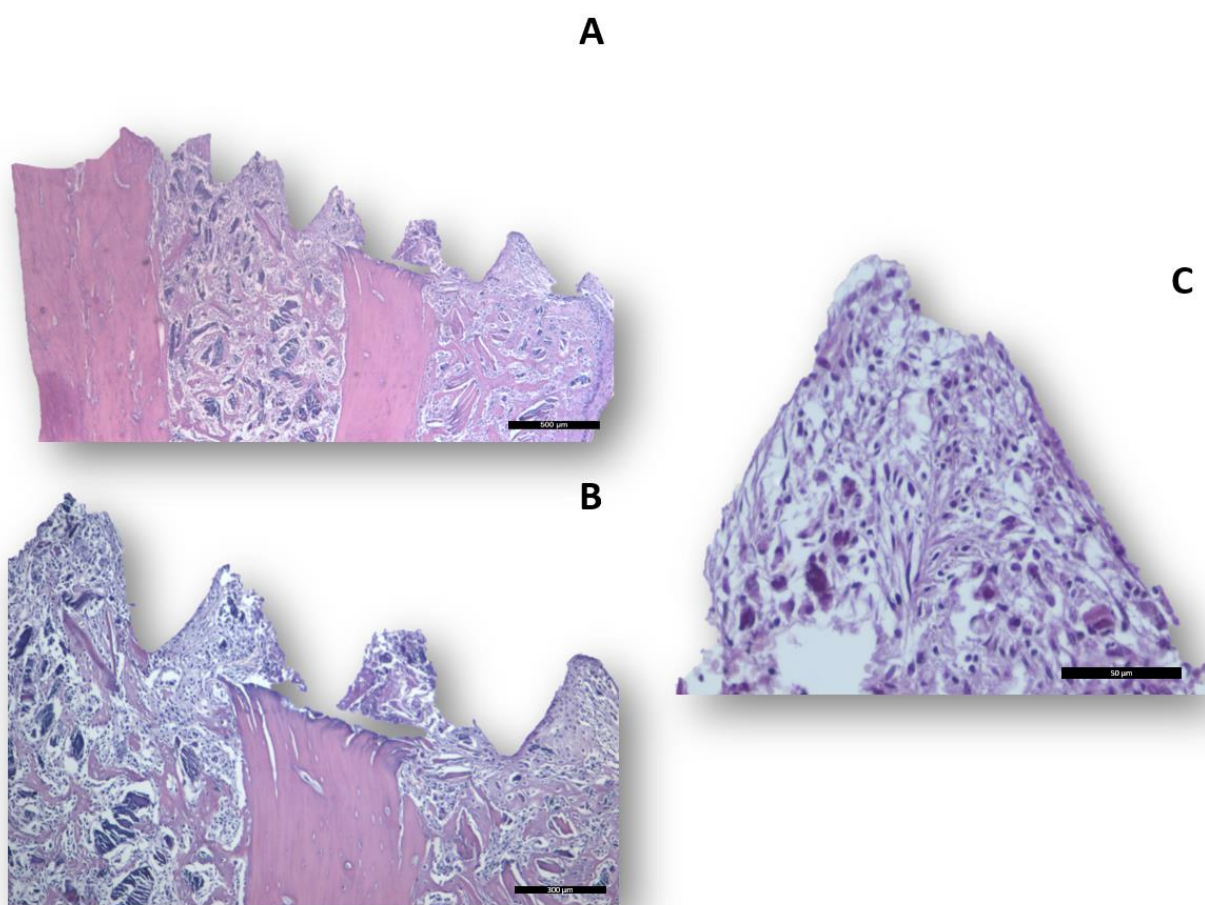


Figura 14: Reparo Peri-implantar – SC-gama 7 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

Grupo PPAR GAMA 15 dias: Observa-se fina camada de tecido ósseo em contato com o implante, alternado por tecido conjuntivo frouxo na porção medular da tíbia. Nas corticais, as áreas de rosca encontram-se preenchidas predominantemente por tecido ósseo em maturação, Adjacente à cortical apresenta-se calo ósseo com ilhas de neoformação óssea e osso maturado.

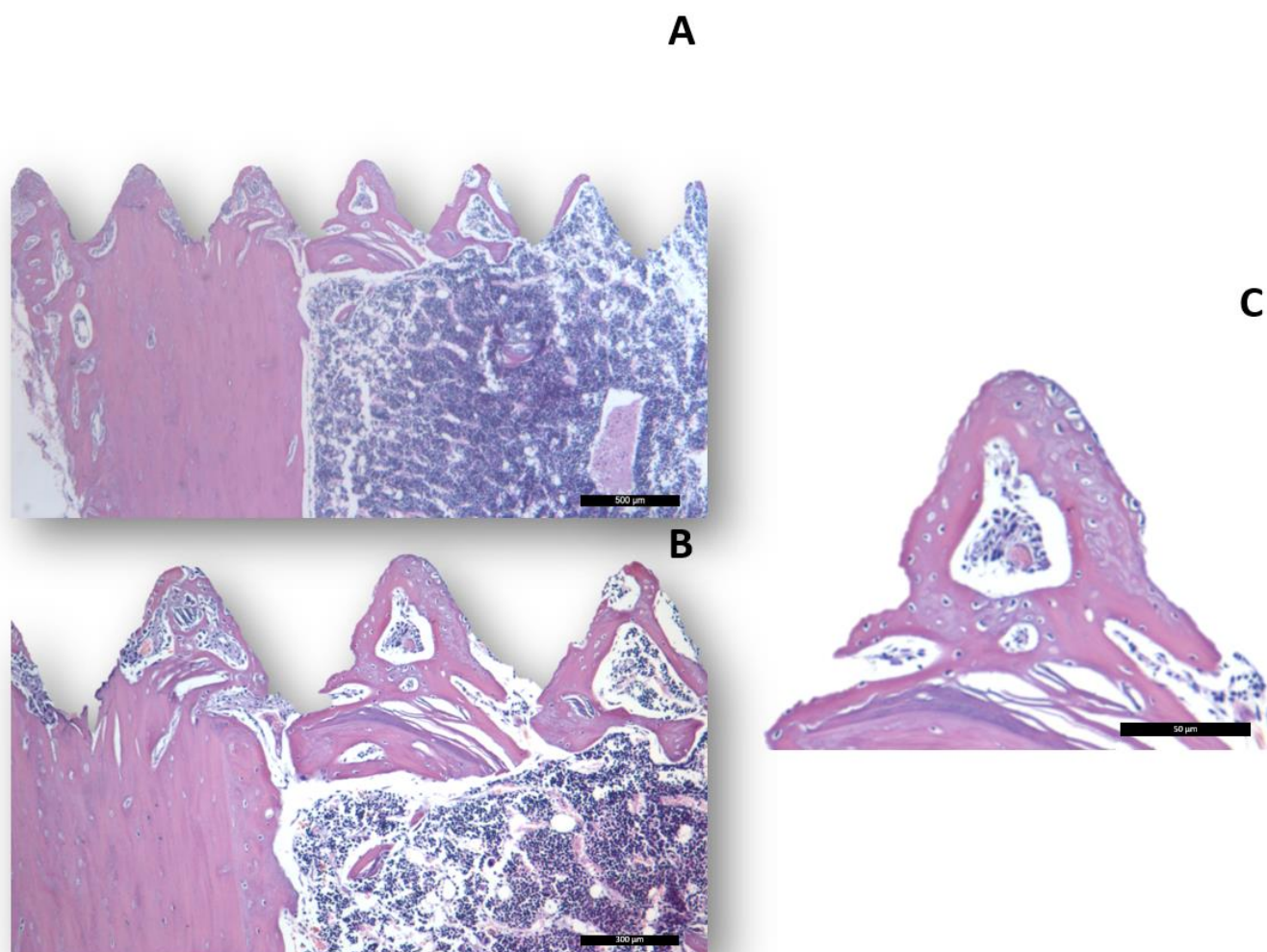


Figura 15: Reparo Peri-implantar – SC-gama 15 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

Grupo PPAR GAMA 45 dias: Aos 45 dias, nota-se delgada camada de tecido ósseo em contato com o implante, alternado por tecido hematopoiético na porção medular da tíbia. Nas corticais, as áreas de rosca encontram-se preenchidas por tecido ósseo em remodelação. Calo ósseo ausente referindo possível reabsorção tendendo ao osso basal.

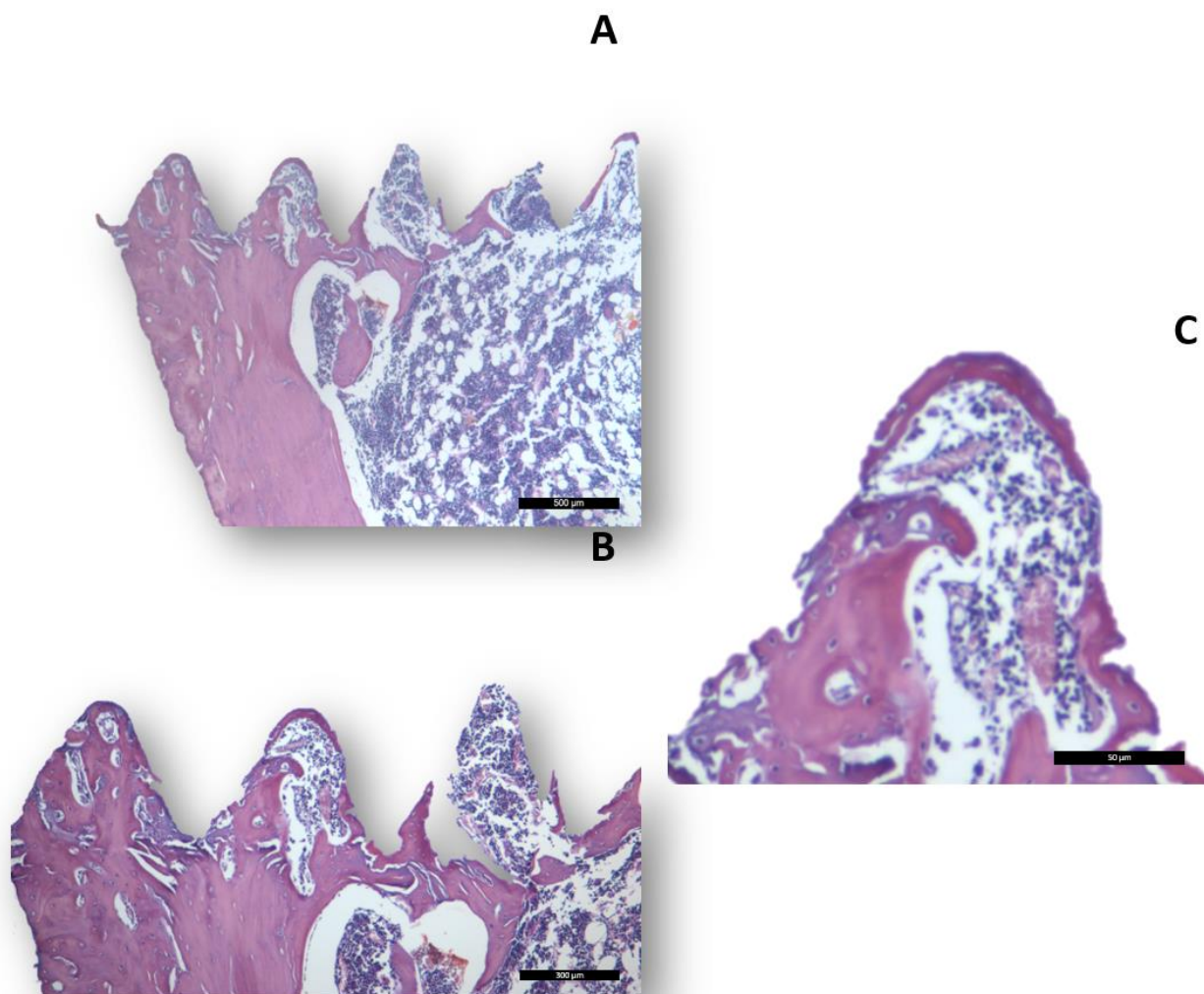


Figura 16: Reparo Peri-implantar – SC-gama 45 dias. Fotomicrografia em aumento de 5x(A) 10x(B) e aumento de 40x (C). Fonte: A autora, 2020

4.2 Planejamento estatístico

Foi realizada técnica de amostragem sistemática baseada na coleta dos dados da massa corporal. A partir do processamento laboratorial e estabelecimento dos elementos para avaliação, foi realizada a análise estatística descritiva e inferencial para as peças de defeito ósseo, os dados de massa corporal inicial, massa corporal final e glicemia em jejum. Os dados são apresentados como média, mediana e desvio padrão. Diferenças estatísticas entre os grupos SC e SC-gama avaliados no mesmo período de tempo (7, 15 ou 45 dias) foram testadas com o teste t com correção de Welch. Foi utilizado o software GraphPad Prism® 8.0.1 (La Jolla, CA, USA) e adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4.2.1 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com três imagens obtidas da porção superior da tíbia de cada animal partindo da região central do defeito, área 1 (A1), a segunda correspondendo à porção lateral à direita (A2) e a terceira correspondendo à porção lateral à esquerda (A3). As imagens foram analisadas no software ImageJ 1.51J8 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) onde foi obtido a média dos valores de: tecido conjuntivo (TC), osso neoformado (ON), osso maduro (OM), e outros tecidos (OU) correspondendo a células inflamatórias, vasos sanguíneos e eritrócitos.

Em relação à tecido conjuntivo (Gráfico 1) não foi encontrada diferença estatística comparando o controle e o grupo tratado nos tempos de 7 e 45 dias apresentando $p=0,0587$ e $p=0.3963$, respectivamente. No período de 15 dias, o grupo teste apresentou significância estatística, quando comparado ao grupo controle, apresentando $p=0,0004$

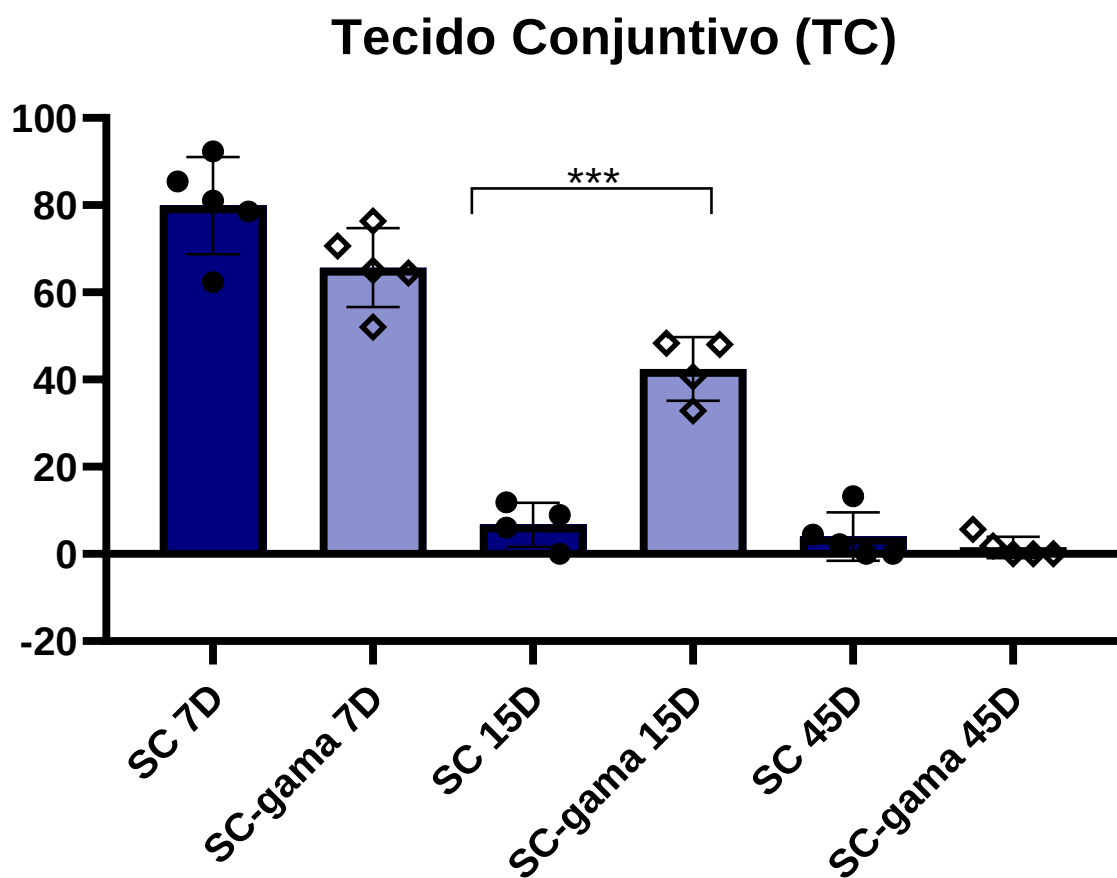


Gráfico 1: Comparação entre SC e SC-gama em relação à presença de tecido conjuntivo nos tempos 7, 15 e 45 dias. *** $P<0,001$.

Em relação ao osso neoformado (Gráfico 2) observa-se diferença estatística nos dois períodos iniciais, com $p=0,0374$ em ON 7D e $p= 0,0134$ em ON 15D. O grupo SC-gama apresenta uma aceleração inicial na apresentação de osso neoformado que diminui substancialmente no período intermediário e por fim se iguala no último período em comparação ao grupo controle.

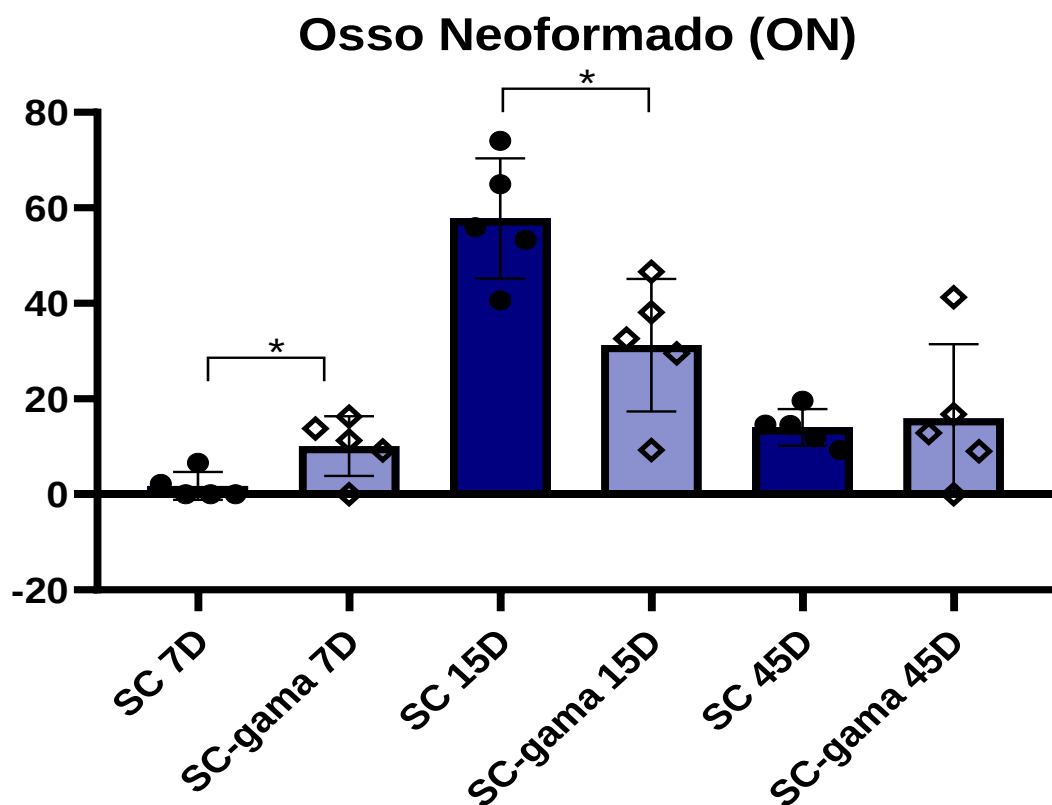
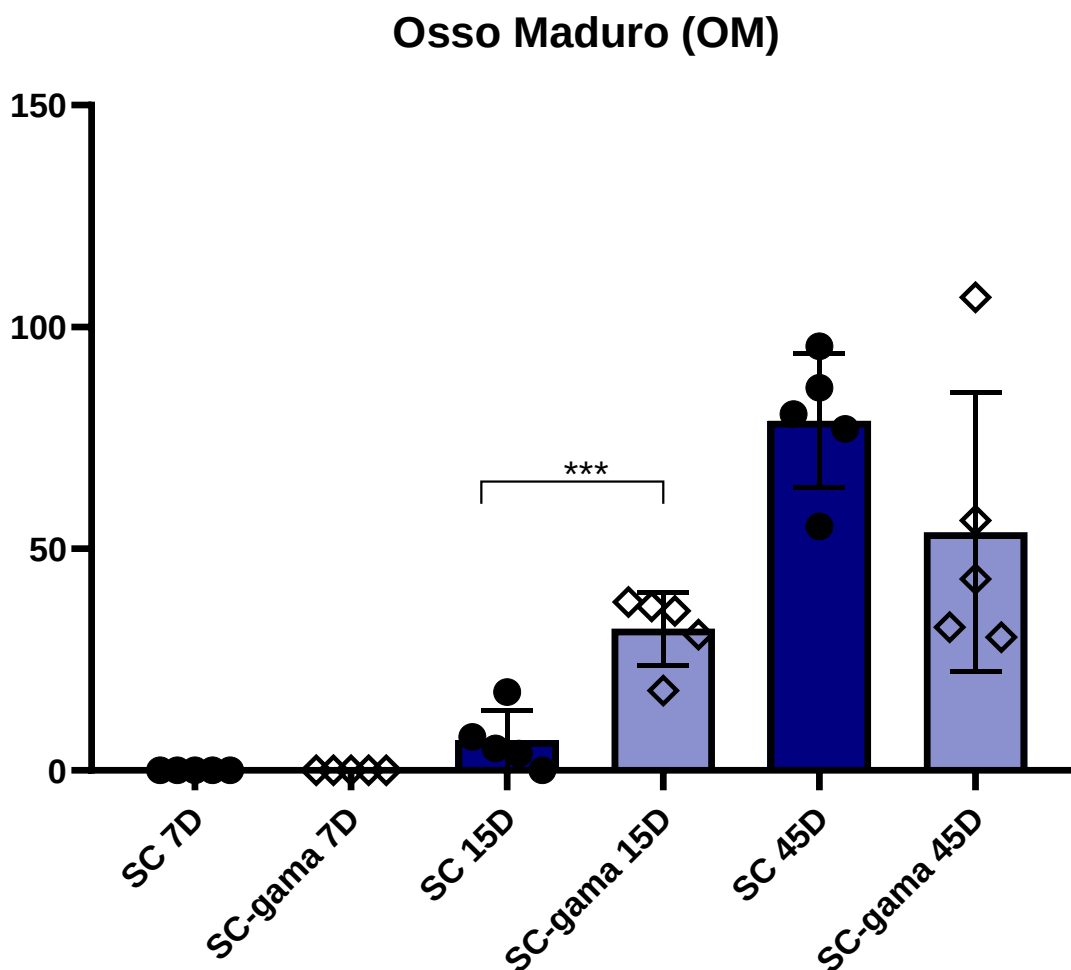


Gráfico 2: Comparação entre SC e SC-gama em relação a neoformação óssea nos tempos 7, 15 e 45 dias . * $P<0,05$

Na apresentação de osso maduro (Gráfico 3), nos tempos iniciais, ambos se igualam e a seguir apresenta-se um aumento significativo do grupo SC-gama ($p= 0,0009$) em 15 dias em comparação ao grupo controle. No último período apesar de não existir significância, há uma tendência maior valor de OM para o grupo SC.



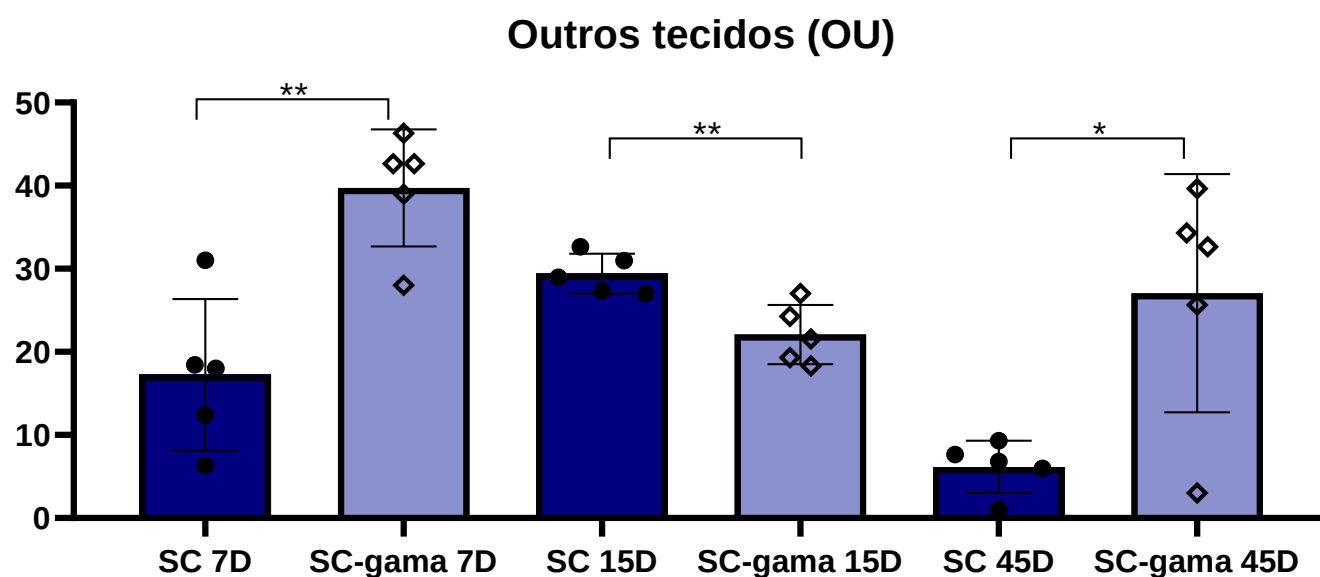
Gráficos 3 : Comparação entre SC e SC-gama em relação a presença de osso maduro . *** $P<0,001$.

Para estabelecer comparação da neoformação óssea, foi realizada razão da média dos dados de osso maduro no período de 45 dias, pelos dados de osso neoformado no período de 15 dias de cada grupo; onde observamos um valores na Tabela 1. Subtraindo o valor obtido do grupo tratado pelo grupo controle obtivemos uma taxa de neoformação óssea de 0,4 em média, onde o grupo SC-gama parece apresentar taxa de neoformação óssea levemente maior que o grupo SC.

Estatísticas Descritivas

		Grupos	
		SC	SC-gama
Número de valores		5	5
ON 15D	Média	57,79	31,26
	Mediana	55,99	32,66
	Desvio Padrão	12,56	13,87
OM 45D	Média	78,86	53,70
	Mediana	80,33	43,16
	Desvio Padrão	15,11	31,39
Razão OM45/ON 15		1,36	1,71

Tabela 1: Estatísticas descritivas. Valores de média , mediana, desvio padrão e a Razão OM45/ON15 para os grupos teste e controle nos tempos 15 dias e 45 dias.



Gráficos 4 : Comparação entre SC e SC-gama em relação a presença de outras células (a células inflamatórias , vasos sanguíneos e heritrócitos. *P<0,05 **P<0,01

4.2.2 Massa Corporal

Os dados da massa corporal de todos os animais foram coletados ao início e ao final do experimento e foram tabulados. Em relação a massa corporal inicial (Gráfico 5) em ambos os grupos os dados estão distribuídos de forma semelhante e não apresentam diferença estatística. A massa corporal final (Gráfico 6) apresentou diferença estatística, com valor de $P < 0,0001$, indicando uma ação do agonista PPAR-gama no aumento da massa corporal.

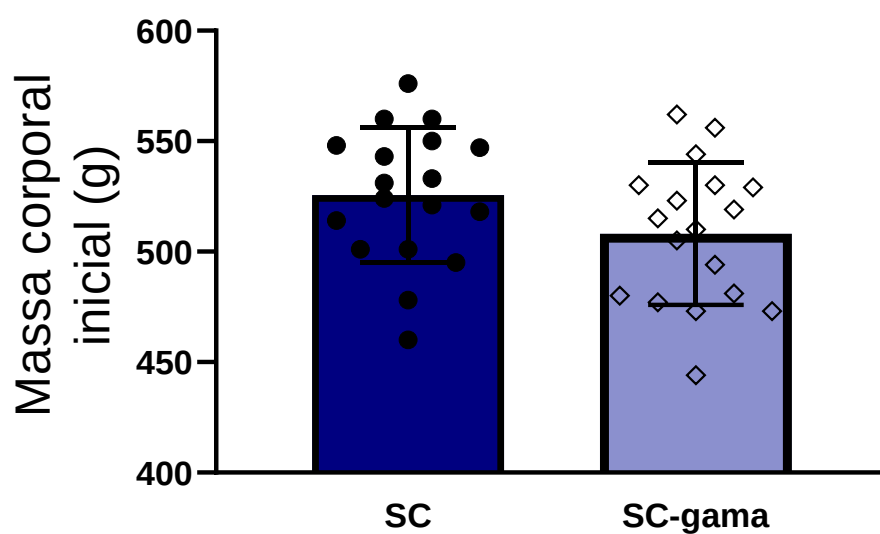


Gráfico 5: Massa corporal inicial (g).

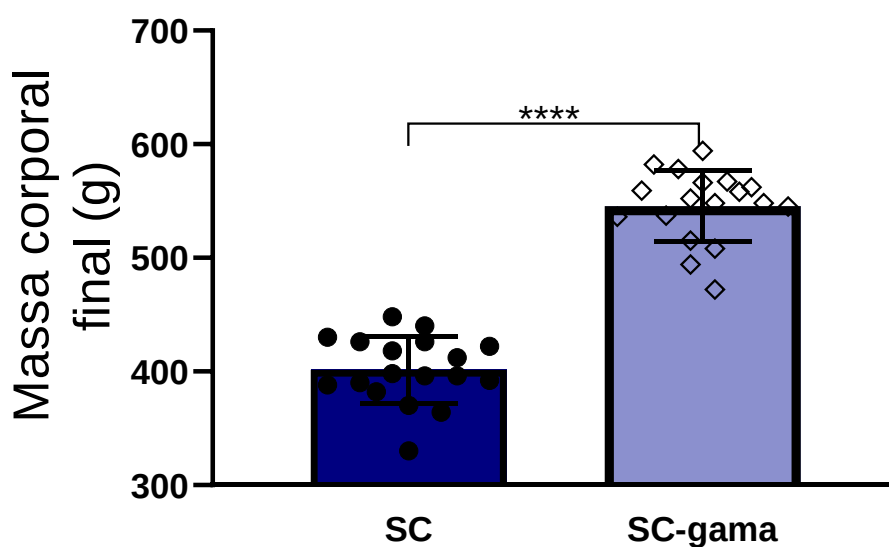


Gráfico 6: Massa corporal final (g) **** $p = < 0,0001$.

4.2.3 Glicemia e TITG

Foi avaliada a glicemia de jejum, e após a aplicação intraperitoneal de solução glicosada, também houve a coleta dos dados da glicemia nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Não foi encontrada significância ($p= 0,1848$) em relação a glicemia em jejum (gráfico 7) e nem diferença na área sob a curva no TITG (gráfico 8). Esses resultados demonstram similaridade entre os grupos no que se refere ao metabolismo glicídico.

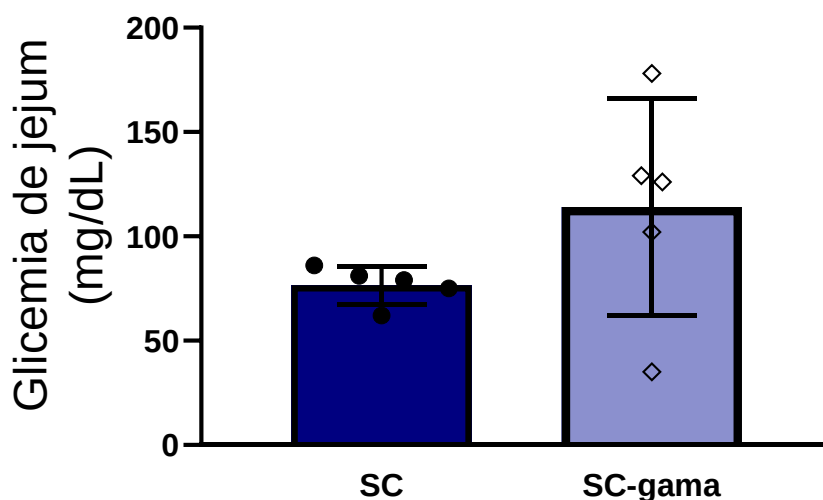


Gráfico 7: Glicemia de jejum (mg/dL).

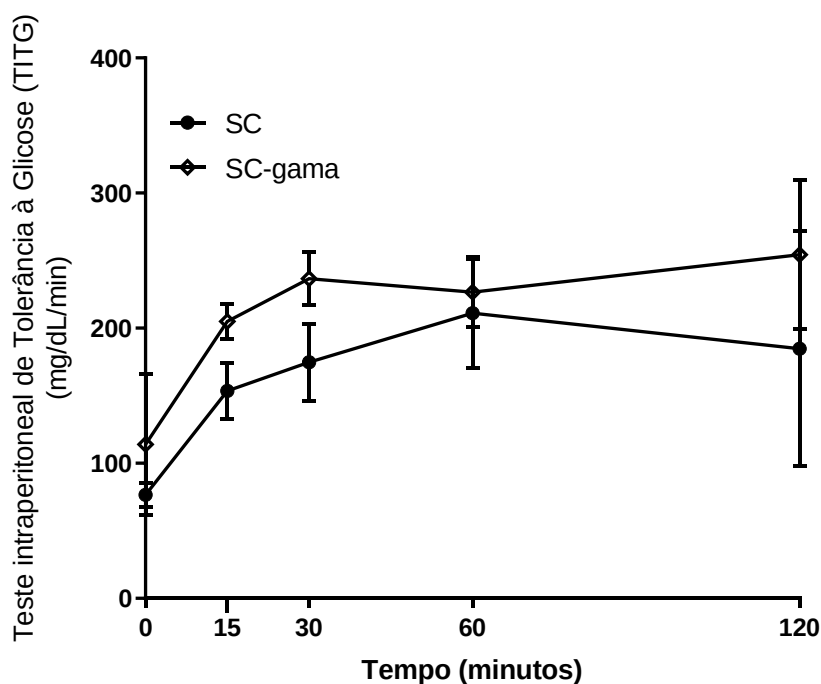


Gráfico 8: Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose- TITG (mg/min).

5. Discussão

O processo fisiológico do reparo tecidual consiste em diversas fases e em uma sequência de eventos que se intercalam e promovem a possibilidade da regeneração ou cicatrização do tecido afetado. Desta forma, o conceito de reparo tecidual pode ser entendido como os processos necessários para que a função exercida pelo tecido originário possa ser restabelecido [38, 39]. A inflamação proveniente da injúria se faz fundamental para que o reparo tecidual aconteça. O rompimento do tecido, levando à ativação da cascata do ácido aracdônico, é o primeiro passo para que se estabeleça o reparo [38]. A interposição de eventos a partir da injúria, passando pela formação do coágulo, proliferação fibroblástica, migração de células osteoprogenitoras, levam ao restabelecimento da dinâmica aposicional presente em ossos maduros e funcionais [2, 39].

Dentro dos modelos utilizados para pesquisa no campo de reparo e regeneração óssea, o rato macho Wistar tem destaque pois sua semelhança filogenética estabelece eventos muito semelhantes, permitindo que a verificação de pertinência em ensaios pré-clínicos possa gerar dados robustos para a formação do conhecimento necessário acerca do tema proposto. Desta forma, a utilização do presente modelo animal [40, 41], justifica-se não apenas pelos fatores logísticos envolvidos como fácil disponibilidade, devido à estrutura do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, bem como, os fatores fisiológicos descritos em estudos prévios.

A coloração de HE é largamente descrita como boa opção para avaliação de eventos celulares envolvidos em processos como patologias e reparo tecidual. Tendo sido de grande valia para a descrição de tecidos em diversas pesquisas, possuindo vantagens como custo reduzido e facilidade em sua reprodução quanto à técnica histológica. Desta forma, sua escolha como técnica histológica para avaliação do reparo ósseo no presente estudo faz-se pertinente [42, 43].

A utilização de agonistas PPARs tem sido descrita amplamente na literatura em relação aos seus efeitos positivos sobre massa corporal, ingestão alimentar e esteatose hepática,

geradas por diferentes dietas [44, 45]. O PPAR-gama foi o receptor descoberto mais recentemente e é responsável por controlar a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético, como a diferenciação de adipócitos e a ação da insulina [46].

A pioglitazona tem sido usada na prática clínica desde 1999, e apesar de seus benefícios, seu uso tem sido associado a efeitos adversos nos ossos humanos [47]. Estudos anteriores tentaram definir o mecanismo responsável pelas alterações do metabolismo ósseo mediados pelas TZDs, sugerindo que essas drogas podem causar perda óssea pela supressão da formação óssea [48-50]. Xu F et al 2016 sugerem que o uso da pioglitazona suprime a osteoblastogênese e promove a osteoclastogênese, uma vez que em seu estudo a pioglitazona inibiu a diferenciação osteoblástica e promoveu a diferenciação osteoclástica dos monócitos; e a análise ELISA indicou aumento do RANKL e diminuição da expressão de OPG nas células pré osteoblásticas tratadas [50].

Kanda et al 2017 sugerem a capacidade da pioglitazona em suprimir a formação óssea, aumentar a função osteoclástica e a reabsorção óssea. O estudo demonstrou fragilidade óssea pela diminuição da densidade mineral óssea do fêmur tratado e diminuição das propriedades de força óssea além da diminuição da área mineralizada e da superfície de osteoblastos enquanto a área de osteoclastos e seu número aumentou após o tratamento com pioglitazona. [51].

Meier et al 2008 examinaram a associação do uso de TZDs e outros agentes antidiabéticos ou insulina e o risco de fratura. Nesse estudo, foram pareados 1020 pacientes com trauma de baixo impacto resultando em fratura e 3728 controles. Os medicamentos rosiglitazona e pioglitazona foram usados mais frequentemente pelos pacientes com fratura, tendendo a aumentar com a dose/ tempo. A associação foi considerada independente de idade e sexo e não foi encontrado risco alterado de fratura para o uso dos demais antidiabéticos [52].

Loke et al 2008 realizaram uma meta-análise associando o risco de fratura no diabetes tipo 2 e o uso das TZDs na qual elegeram 10 ensaios clínicos randomizados de longo prazo, maior que 52 semanas, envolvendo 13.715 participantes. Em todos os ensaios houve um aumento

significativo do risco de fratura e em metade deles houve aumento do risco em mulheres, mas não em homens, associado às TZDs [53].

Pavlova et al em 2018 avaliou o risco de fratura e o uso da pioglitazona em uma revisão sistemática com meta-análise. Os autores apontam que majoritariamente os dados dos efeitos das TZDs na literatura se devem à utilização da rosiglitazona. Das 1536 fontes, seis estudos foram eleitos, incluindo 3172 pacientes. Não houve aumento significativo para o risco de fratura comparando pioglitazona e outras drogas antidiabéticas ou placebo; e não foi encontrado associação entre o tempo de duração do tratamento, que se estabeleceu entre 56 e 192 semanas [54].

Após a instalação do implante osseointegrável o contato entre osso e implante é fundamental para definir a forma de ossificação que ocorrerá na área, podendo ocorrer ossificação por contato ou ossificação à distância. Durante as primeiras etapas da fase proliferativa os fibroblastos que migraram para a área passam a secretar matriz colágena unindo o osso ao implante, da mesma forma as pontes de fibrina presentes no coágulo também passam a ligar osso e implante e em parte participam como arcabouço para as células que migram para o local injuriado [55-57].

A camada de óxido que cobre o implante e o mantém bioinerte passa a ter grande importância como característica de superfície, pois sua geometria microscópica pode variar de acordo com o tipo de tratamento, mas a camada de óxido que permite que ocorra a ancoragem das pontes de fibrina, fibras colágenas e posterior tecido ósseo neoformado. A modificação da superfície permite que um maior número de ancoragem ocorra por unidade de área em virtude de um conceito geométrico conhecido como geometria fractal [58-60].

A modificação mais utilizada nas diferentes marcas presentes no mercado é a modificação por subtração ácida, desta forma a utilização dos implantes presentes neste estudo justifica-se por ser a condição clínica, ao extrapolar-se para a clínica, mais encontrada em implantodontia [58, 59, 61].

No presente estudo, os achados histológicos apresentados pelo defeito e implante nos três tempos em ambos os grupos controle e teste foram comparados. Em relação ao defeito ósseo, no período de 15 dias no grupo teste (Figura 8) observa-se leve atraso quanto ao estágio do reparo em comparação ao grupo controle (Figura 5). Há maior quantidade de osso neoformado no grupo controle que no tratado (Gráfico 2), o que sugere que o processo de diferenciação e remodelação é lento no grupo tratado.

Tal achado mostra-se congruente com a toda literatura prévia relacionada ao PPAR-gama. Bem como o período de 45 dias, onde o grupo que recebeu o tratamento apresentou a não corticalização total do defeito (Figura 9), que no modelo utilizado não é um defeito considerado crítico. Além de ser importante observar que na região medular, no último período, o grupo controle apresentou trabéculas e adipócitos maiores enquanto o grupo teste apresentou atividade osteoclástica intensa, adipócitos maduros e trabéculas menores (Figura 10), mesmo que não haja diferença estatística em significativo em OM (Gráfico 3). O que corrobora para os achados de Meier et al 2018 em relação ao uso a longo prazo da pioglitazona e o risco de fratura [52].

Os achados histológicos apresentados pelos implantes instalados nas tíbias divergem ao que fora encontrado no grupo SC-gama defeito ósseo. Observamos aos 7, 15 e 45 dias, para o grupo controle, respectivamente, a predominância de tecido conjuntivo frouxo, tecido ósseo neoformado em estágio inicial de maturação e osso neoformado já com dinâmica aposicional bem estabelecida. Para o período inicial e final (Figuras 14 e 16), o grupo SC-gama implante não apresentou diferenças suficientemente grandes em relação ao reparo peri-implantar. No período de 15 dias, o grupo SC-gama apresentou atraso em relação ao grupo controle ao avaliar o tecido ósseo em maturação em contato com implante. Infere-se que tal achado possa se relacionar com a diferença de tamanho tridimensional a ser preenchido por tecido em razão do espaço ocupado pelo implante, diminuindo a necessidade de maiores aportes celulares nas diferentes fases do reparo ósseo. Pode-se levar em conta também que o tratamento de superfície do implante utilizado possa ter sido

um fator a estimular a neoformação óssea e a organização lamelar ao redor das espiras do implante [15, 62].

A medicação utilizada neste estudo, apesar de favorecer a reabsorção óssea [51], não se colocou como um fator impeditivo para a instalação de implantes osseointegráveis, uma vez que os eventos celulares presentes no reparo periimplantar não sofreram demasiada alteração, apesar de ser necessário mais estudos que avaliem e quantifiquem parâmetros periimplatares.

Os resultados referentes a massa corporal , glicemia em jejum e TITG demonstram similaridade entre os grupos no que se refere ao metabolismo glicídico e são compatíveis com os achados na literatura [32-34, 37].

A presença de cartilagem hialina, por sua vez, não foi considerada risco para pseudoartrose, uma vez que o osso utilizado no estudo apresenta característica embrionária de ossificação endocondral. Mostram-se necessários, portanto, estudos posteriores com avaliação de um modelo que avalie o uso do agonista e o processo de reparo em ossos gnáticos.

Faz-se necessário no futuro mais pesquisas que utilizem um modelo experimental de diabetes tipo 2 para revelar os efeitos das TZDs no metabolismo ósseo nesse contexto. Considerando, não apenas o modelo saudável, mas também modelos que induzam o diabetes, seja pela supressão da atividade pancreática das células beta, bem como a indução da síndrome metabólica via alimentação do espécime animal, para que novos dados sejam colhidos, na intenção de definir se o uso desta classe de medicamento pode influir na instalação de implantes dentários, tornando-se uma contraindicação relativa ou absoluta.

O estudo inicial, em se tratando de compor um modelo animal, leva à necessidade de explorar mais análises e que metodologias clínicas sejam efetuadas para que os dados colhidos nos testes pré-clínicos sejam definitivamente validados.

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- Em relação ao reparo ósseo, em 15 dias há maior quantidade de osso neoformado no grupo controle que no tratado, sugerindo que o processo de diferenciação e remodelação é lento no grupo tratado. Há maior quantidade de tecido conjuntivo no grupo teste, sugerindo um atraso no reparo tecidual, porém todos os parâmetros avaliados se igualam numericamente no último período. Na análise descritiva podemos notar a diminuição no número de trabéculas no grupo tratado, o que pode ser explicado pelo n reduzido da pesquisa.

- Em relação ao reparo peri-implantar, a análise histológica descritiva demonstrou que comportamento biológico dentro da área de interesse demonstrou atraso no período de 15 dias contudo foi semelhante nos tempos inicial e final.

Por isso são necessárias mais pesquisas que abordem esse tema, avaliando não só o uso da medicação, mas também um modelo de obesidade para mais respostas.

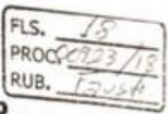
7. Referências Bibliográficas

1. Yamaguchi, A., T. Komori, and T. Suda, *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(4): p. 393-411.
2. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. *J Clin Pathol*, 2008. **61**(5): p. 577-87.
3. Chavda, S. and L. Levin, *Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: A systematic review*. *J Oral Implantol*, 2017.
4. Carvalho, A.C.P.d. and T. Okamoto, *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica*, in *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica*. 1987. p. 139-139.
5. Hoang, Q.Q., et al., *Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 977-80.
6. Barbato, P.R., et al., *Perdas dentárias e fatores sociais, demográficos e de serviços associados em adultos brasileiros: uma análise dos dados do Estudo Epidemiológico Nacional (Projeto SB Brasil 2002-2003)*. *Cadernos de Saúde Pública*, 2007. **23**(8): p. 1803-1814.
7. Borges, C.M., et al., *Perfil das perdas dentárias em adultos segundo o capital social, características demográficas e socioeconômicas*. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2014. **19**: p. 1849-1858.
8. Peres, M.A., et al., *Perdas dentárias no Brasil: análise da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010*. *Revista de saúde pública*, 2013. **47**: p. 78-89.
9. Monteiro, A.R.d.S., *Implantes dentários: história e evolução*. 2015.
10. Magini, R.d.S. and C. Schiochett, *Históricos dos implantes: do sonho a realidade*. *Rev. bras. odontol*, 1999: p. 245-51.
11. Branemark, P.-I., *Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period*. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.*, 1977. **16**.
12. Schenk, R.K. and D. Buser, *Osseointegration: a reality*. *Periodontology 2000*, 1998. **17**(1): p. 22-35.
13. Albrektsson, T. and C. Johansson, *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. *European spine journal*, 2001. **10**(2): p. S96-S101.
14. Mavrogenis, A., et al., *Biology of implant osseointegration*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2009. **9**(2): p. 61-71.
15. Le Guéhennec, L., et al., *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. *Dental materials*, 2007. **23**(7): p. 844-854.
16. Luvizuto, E.R., et al., *The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects*. *Biomaterials*, 2011. **32**(15): p. 3855-3861.
17. Hunziker, E.B., et al., *Osseointegration: the slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity*. *Bone*, 2012. **51**(1): p. 98-106.
18. Motyl, K.J., L.R. McCabe, and A.V. Schwartz, *Bone and glucose metabolism: a two-way street*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **503**(1): p. 2-10.
19. Halade, G.V., et al., *Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice*. *Exp Gerontol*, 2011. **46**(1): p. 43-52.
20. Lee, N.K., et al., *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. *Cell*, 2007. **130**(3): p. 456-69.
21. Emami, E., et al., *The impact of edentulism on oral and general health*. *International journal of dentistry*, 2013. **2013**.
22. Hewlett, S.A., et al., *Edentulism and quality of life among older Ghanaian adults*. *BMC oral health*, 2015. **15**(1): p. 48.
23. Tyrovolas, S., et al., *Population prevalence of edentulism and its association with depression and self-rated health*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 37083.
24. Villareal, D.T., et al., *Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society*. *Obesity research*, 2005. **13**(11): p. 1849-1863.
25. Duque, G., *Bone and fat connection in aging bone*. *Current opinion in rheumatology*, 2008. **20**(4): p. 429-434.
26. Naveiras, O., et al., *Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment*. *Nature*, 2009. **460**(7252): p. 259-263.
27. Oh, S.-R., et al., *Saturated fatty acids enhance osteoclast survival*. *Journal of lipid research*, 2010. **51**(5): p. 892-899.

28. Horowitz, M.C., et al., *Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(1): p. 9-18.
29. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
30. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 421-424.
31. Lecka-Czernik, B., *PPARs in bone: the role in bone cell differentiation and regulation of energy metabolism*. Current osteoporosis reports, 2010. **8**(2): p. 84-90.
32. Sen, S., et al., *The Kruppel-like factor KLF2 inhibits PPAR γ expression and adipogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2002.
33. Kahn, S.E., et al., *Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT)*. Diabetes care, 2008. **31**(5): p. 845-851.
34. Meier, C., et al., *Use of thiazolidinediones and fracture risk*. Archives of Internal Medicine, 2008. **168**(8): p. 820-825.
35. Patel, J.J., O.R. Butters, and T.R. Arnett, *PPAR agonists stimulate adipogenesis at the expense of osteoblast differentiation while inhibiting osteoclast formation and activity*. Cell biochemistry and function, 2014. **32**(4): p. 368-377.
36. Refaat, R., et al., *Combination of Vildagliptin and Pioglitazone in Experimental Type 2 Diabetes in Male Rats*. Drug Dev Res, 2016. **77**(6): p. 300-9.
37. Attia, R.T., et al., *Raspberry ketone and Garcinia Cambogia rebalanced disrupted insulin resistance and leptin signaling in rats fed high fat fructose diet*. Biomed Pharmacother, 2019. **110**: p. 500-509.
38. Consolaro, A., *Inflamação e reparo*. Maringá: Dental Press, 2009. **19**: p. 22.
39. Fonseca, R.J., *Oral and Maxillofacial Surgery-E-Book: 3-Volume Set*. 2017: Elsevier Health Sciences.
40. Hamann, C., et al., *Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2011. **301**(6): p. E1220-E1228.
41. Willett, N.J., et al., *Attenuated human bone morphogenetic protein-2-mediated bone regeneration in a rat model of composite bone and muscle injury*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2013. **19**(4): p. 316-325.
42. Liu, H., et al., *Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining*. BioMed research international, 2017. **2017**.
43. Jörundsson, E., J.H. Lumsden, and R.M. Jacobs, *Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains*. Veterinary clinical pathology, 1999. **28**(3): p. 100-108.
44. Fernandes-Santos, C., et al., *Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet*. Nutrition, 2009. **25**(7-8): p. 818-27.
45. Nagasawa, T., et al., *Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet*. Eur J Pharmacol, 2006. **536**(1-2): p. 182-91.
46. Festuccia, W.T., P.G. Blanchard, and Y. Deshaies, *Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPARgamma*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 84.
47. Lecka-Czernik, B., *Bone as a target of type 2 diabetes treatment*. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000), 2009. **10**(10): p. 1085-1090.
48. Takada, I., et al., *Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. **1116**(1): p. 182-195.
49. Wei, W., et al., *PGC1 β mediates PPAR γ activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss*. Cell metabolism, 2010. **11**(6): p. 503-516.
50. Xu, F., et al., *Pioglitazone affects the OPG/RANKL/RANK system and increase osteoclastogenesis*. Mol Med Rep, 2016. **14**(3): p. 2289-96.
51. Kanda, J., et al., *Effect of the antidiabetic agent pioglitazone on bone metabolism in rats*. Journal of pharmacological sciences, 2017. **135**(1): p. 22-28.
52. Meier, C., et al., *Use of thiazolidinediones and fracture risk*. Arch Intern Med, 2008. **168**(8): p. 820-5.

53. Loke, Y.K., S. Singh, and C.D. Furberg, *Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis*. CMAJ, 2009. **180**(1): p. 32-9.
54. Pavlova, V., et al., *Pioglitazone Therapy and Fractures: Systematic Review and Meta-Analysis*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2018. **18**(5): p. 502-507.
55. Dimitriou, R., et al., *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC medicine, 2011. **9**(1): p. 1-10.
56. Chen, Y. and J. Cao, *Analysis of Pelvic Fracture Healing Status in 198 Cases*. Fa yi xue za zhi, 2019. **35**(3): p. 349-352.
57. Terheyden, H., et al., *Osseointegration—communication of cells*. Clinical oral implants research, 2012. **23**(10): p. 1127-1135.
58. Mistry, S., et al., *Safety and efficacy of additive and subtractive surface modification of Ti6Al4V endosseous implant in goat bone*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2016. **57**: p. 69-87.
59. Witek, L., et al., *Assessing osseointegration of metallic implants with boronized surface treatment*. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, 2020. **25**(3): p. e311.
60. Perrotti, V., et al., *Fractal analysis: a novel method to assess roughness organization of implant surface topography*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2011. **31**(6).
61. Bondarenko, S., et al., *Comparative analysis of osseointegration in various types of acetabular implant materials*. HIP International, 2018. **28**(6): p. 622-628.
62. Albrektsson, T. and A. Wennerberg, *Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them*. International Journal of Prosthodontics, 2004. **17**(5).

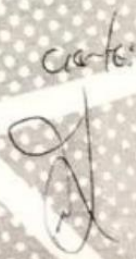
Anexo A – Comitê de ética em estudo animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos da ativação do PPAR-Gama no reparo ósseo, osseointegração de implantes dentários, na histologia hepática e do tecido adiposo branco em ratos obesos"**, Processo FOA nº 00923-2018, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Dezembro de 2018.
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2020.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2020.

CERTIFICATE
We certify that the study entitled **"Effects of PPAR-Gama activation on bone repair, osseointegration of dental implants, on hepatic histology and white adipose tissue in obese rats"**, Protocol FOA nº 00923-2018, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 13, 2018.
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2020.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator


CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (12) 3636-3234 Email CEUA: ceua@fca.unesp.br

ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO: THE INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS GUIDELINES FOR AUTHORS MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service: www.manuscriptmanager.com/jomi Manuscripts should be uploaded as a Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. No paper version is required. Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.) Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES

All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See <http://www.icmje.org>
- Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

- Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first- listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- Abstract/key words. The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.
- Article text. Currently there is no article page limit (within reason).
- Acknowledgments. Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- Legends. Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- Tables. Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.
- Numbers. Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

- Avoid using abstracts as references.

• Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s). Journal reference style: 1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525–531.

Book reference style: 1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:269–286

ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to: Managing Editor JOMI Quintessence Publishing Co, Inc 4350 Chandler Drive Hanover Park, IL 60133 Email: jomi.submit@quintbook.com

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or

it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory

Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.