

FACULDADE SETE LAGOAS - FACSETE
Especialização em Implantodontia

Melyna Marques de Almeida

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALFA E BETA AMIRINA NA
OSSEOINTEGRAÇÃO EM TEMPO PRECOCE DE IMPLANTES DE
TITÂNIO.**

MARÍLIA - SP
2023

Melyna Marques de Almeida

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALFA E BETA AMIRINA NA OSSEOINTEGRAÇÃO EM TEMPO PRECOCE DE IMPLANTES DE TITÂNIO.

Monografia apresentada ao curso de especialização Lato Sensu da Faculdade Sete Lagoas - FACSETE, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Implantodontia.

Orientador: Prof.^a Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Área de concentração: Implantodontia

MARÍLIA - SP
2023

FACULDADE DE SETE LAGOAS - FACSETE

Melyna Marques de Almeida

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALFA E BETA AMIRINA NA
OSSEOINTEGRAÇÃO EM TEMPO PRECOCE DE IMPLANTES DE TITÂNIO.**

Monografia apresentada ao curso de especialização Lato Sensu da Faculdade Sete Lagoas - FACSETE, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Implantodontia.

Área de concentração: Implantodontia

Aprovada em 18/09/2023 pela banca constituída dos seguinte professores



Prof. Orientador^a Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior



Profa. Dra. Juciléia Maciel



Prof. Dr. Albanir Gabriel Borrasca

MARÍLIA - SP

2023

Almeida, MM. Avaliação da utilização sistêmica de alfa e beta amirina na osseointegração em tempo precoce de implantes de titânio.

RESUMO

Buscam-se cada vez mais recursos auxiliem a no processo de reparo perimplantar, a fim de melhorar a eficácia da osseointegração. Assim a resina extraída da árvore *Protium heptaphyllum* vem sendo estudada e recebe destaque por suas vastas propriedades já comprovadas, como a antiinflamatória, analgésica, bacteriostática, antiplaquetária, cicatrizante, hipoglicemiante, ansiolítica e antidepressiva, tendo como principais componentes a α e β -amirina. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o processo de reparo perimplantar em tempos iniciais com a utilização sistêmica da α e β -amirina em tíbias de rato. Foram utilizados 20 ratos machos, divididos em 2 grupos. Todos os ratos tiveram implantados em sua tíbia direita um implante de titânio. A divisão dos grupos foi de acordo com o medicamento administrado no pós-operatório através de gavagem, sendo: Grupo I – soro fisiológico 0,9%; Grupo II - solução de α e β -amirina diluída em tween 80 e água destilada. Após 7 dias foi realizada a eutanásia dos ratos através de perfusão transcardíaca e posterior processamento histológico. Resultados: Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros estudados: Tecido Conjuntivo (TC), Medula da Tíbia (MT), Tecido ósseo Neoformado Medular (TONM), Tecido Ósseo Neoformado Cortical (TONC).

Com base nos resultados deste estudo, o grupo amirina apresentou comportamento muito próximo ao do grupo controle, com tendência numérica a neoformação óssea em período precoce, permitindo que a osseointegração ocorra discretamente mais rápida. Contudo, existe a necessidade de mais estudos que utilizem diferentes concentrações da medicação e períodos experimentais.

Palavras-chaves: *Osseointegration, Dental implants, Tíbia, protium hepthathyllum.*

Almeida, MM. Evaluation of the systemic use of alpha and beta amirine in early osseointegration of titanium implants.

MARÍLIA - SP

2023

ABSTRACT

In order to improve the effectiveness of osseointegration, more and more resources are sought to assist in the perimplant repair process. Thus, the resin extracted from the Protium heptaphyllum tree has been studied and is highlighted by its vast properties already proven, as: anti-inflammatory, analgesic, bacteriostatic, antiplatelet, healing, hypoglycemic, anxiolytic and antidepressant, having α and β -amyrins its main components. The objective of this research was to evaluate the process of perimplant repair in early times with the systemic use of α and β -amyrin in rat tibiae. Twenty male rats were used, divided into 2 groups. All rats had a titanium implant implanted in their right tibia. The groups were divided according to the medication administered in the post operative period through gavage, being: Group I - 0.9% saline; Group II - solution of α and β -amyrin diluted between 80 and distilled water. After 7 days, the rats were euthanized by transcardiac perfusion followed by histological processing. Results: There was no statistically significant difference between the groups in the studied parameters: Connective Tissue (CT), Tibial Medulla (MT), Bone Marrow Neoformed Tissue (TONM), Cortical Neoformed Bone Tissue (TONC). Based on the results of this study, the amirine group exhibited very similar behavior to the control group, with a numerical tendency to bone neoformation in an early period, allowing osseointegration to occur slightly faster. However, further studies are needed using different medication measures and experimental periods.

Keywords: Osseointegration, Dental implants, Tibia, protium heptaphyllum.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. PROPOSIÇÃO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	12
3.2. OBTENÇÃO DA A E B-AMIRINA EXTRAÍDA RESINA DE <i>P.</i>	
<i>HEPTAPHYLLUM</i> PARA USO SISTÊMICO	13
3.3. CIRURGIA PARA INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES NA TÍBIA:	13
3.4. PERFUSÃO TRANSCARDÍACA:	15
3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO:	15
3.6. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA:	16
3.7. Eventos considerados para a análise dos resultados.....	16
3.7.1 Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1 COLORAÇÃO HE	17
4.1 COLORAÇÃO PICROSIRIUS	18
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO	24
8. REFERÊNCIAS	25
ANEXOS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Apesar da taxa de sucesso em implantes ser alta, em torno de 90% dos casos, pesquisas são realizadas no intuito de melhorar a osseointegração. Sendo que alguns fatores podem atrapalhar o processo de remodelação óssea necessário para a união entre o osso a superfície do implante, dentre esses fatores estão infecções agudas, inexperiência do cirurgião, falta de estabilidade inicial do implante, parafunção, tabagismo, má higiene bucal, diabetes, radiação de cabeça e pescoço, assim como medicamentos administrados sistemicamente (DU et al., 2009; OUANOUNOU et al., 2016).

Medicamentos que inibem a reabsorção ou induzem a formação óssea vêm sendo muito utilizados em tratamentos de patologias ósseas de caráter óssea-reabsortiva. Atualmente tem sido usado os bifosfonatos, devido sua eficácia comprovada no tratamento destas enfermidades, impedindo a progressão da reabsorção óssea (ALLEN, 2011).

Contudo, os bifosfonados estão relacionados constantemente a problemas como alta permanência da droga ligada ao tecido ósseo, lesões renais e gastrointestinais, fraturas ósseas, risco de osteonecrose e cânceres (WATTS, 2014).

Quando utilizado concomitante aos tratamentos cirúrgicos maxilo-faciais como ocorre com os procedimentos de instalação de implantes osseointegrados enxertos ósseos podem gerar efeitos adversos e até mesmo levar ao insucesso (CHRCANOVIC et al., 2016). Contudo, se administrado em curta duração pode gerar um efeito biológico benéfico. Como mostrado por Oliveira et al. (2017), em que se observa que o tratamento com alendronato de sódio de curto prazo melhorou o reparo ósseo ao redor dos implantes instalados na tíbia de ratos osteoporóticos.

Outra substância muito estudada é a melatonina, responsável por regular a remodelação óssea, uma vez que o papel desse neurohormônio nas respostas biológicas impulsionam o metabolismo ósseo (Gómez-Moreno,2015). Estudos demonstram ainda que a melatonina, quando adicionada aos biomateriais, apresentam boas respostas relacionadas à consolidação óssea, reparo de defeitos periodontais e osseointegração de implantes impregnados com a mesma. (Calvo-Guirado,2009; Ramírez-Fernández,2013). Assim como a reposição hormonal com a melatonina durante osseointegração em deficiência endógena da mesma (Palim, 2018).

Tal como demonstrado, os benefícios que esses fármacos trazem no equilíbrio biológico ósseo podem ser aproveitados a favor dos procedimentos cirúrgicosodontológicos. Com os desafios da prática clínica é natural que ocorra o interesse de buscas por alternativas. Como o emprego de plantas medicinais, sobretudo a aquelas utilizadas pela população, surge a possibilidade do desenvolvimento de novas drogas. O Brasil é um país com grande diversidade vegetal, possuindo, portanto, um enorme potencial para o desenvolvimento de medicamentos que aliem o conhecimento tradicional vinculado às plantas fitoterápicas e a tecnologia, possibilitando ampliar os benefícios gerados com essa substância (Secretaria de Atenção à Saúde/ Ministério da Saúde, 2015).

A resina oleosa obtida da árvore *Protium heptaphyllum* é bastante utilizada na medicina popular e vêm sendo estudada nas áreas de farmacologia, medicina e odontologia, devido ao conhecimento popular de suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, bacteriostática, antiplaquetária, antinoceptiva, em cicatrização de feridas, efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, atividade anticonvulsiva, efeitos ansiolíticos e antidepressivos (ALMEIDA et al., 2015; ARAGÃO et al., 2006; ARAGÃO et al., 2007; ARAGÃO et al., 2008; ARAGÃO et al., 2015; DIAZ-RUIZ et al., 2012; MELO et al., 2011; OKOYE et al., 2014; PINTO et al., 2008; PINTO et al., 2008; SANTOS et al., 2012; SOLDI et al., 2008).

A árvore *Protium heptaphyllum*, pertence à família Burseraceae, também conhecida popularmente por “almecega” e “breu-branco”, é encontrada na região da América do Sul, principalmente na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás, e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai (VIEIRA-JUNIOR et al., 2005). A obtenção da substância é realizada a partir de incisões feitas no tronco da árvore, em que se obtém um óleo-resina aromático, que em contato com o ar se solidifica. É importante ressaltar que o processo de obtenção da resina não causa nenhum tipo de dano à árvore (OLIVEIRA, 2005). Essa resina oleosa exsudada é rica em uma mistura de triterpenos, identificados como α -amirina, β amirina, breína, maniladiol, α -amirona, β -amirona e lupenona, além de um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos (VIEIRA-JUNIOR et al., 2005; LIMA et al., 2014).

Os triterpenos tem chamado atenção nos últimos anos devido as suas atividades terapêuticas. Na resina extraída da *P. heptaphyllum* a maior concentração de triterpenos está na forma de α -amirina e β -amirina, triterpenos pentacíclicos considerados o seu principal componente e principal responsável pelas propriedades terapêuticas citadas acima (ALMEIDA et al., 2015).

Diante das propriedades inerentes que α e β -amirina possa gerar com seu uso sistêmico é de grande interesse clínico saber se existe correlação com o processo de reparo perimplantar em tempos iniciais.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa é avaliar o processo de reparo perimplantar em tempos iniciais com a utilização sistêmica da α e β -amirina em tíbias de rato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia foi apreciada e aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, processo FOA nº 2020 - 0520 (Anexo A).

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 (Nyan M, Hao J, Miyahara T, Noritake K, Rodriguez R, Kasugai S. Accelerated and Enhanced Bone Formation on Novel Simvastatin-Loaded Porous Titanium Oxide Surfaces. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2014; 16:5), para o poder do teste a 0,8, com alfa a 5%, com a diferença da média na ordem de 20, com desvio padrao de 15.6, ficou estabelecido um número de 7 animais por grupo e tempo experimental (Figura

1).

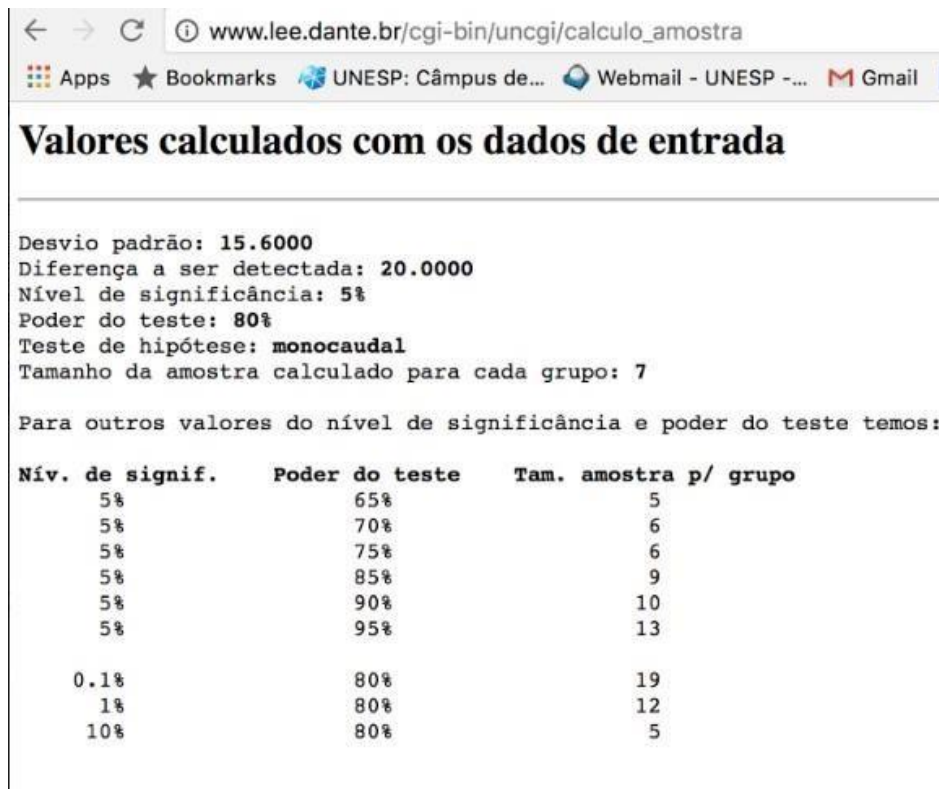


Figura 1 Cálculo do poder da amostra ("Power Test").

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 14 ratos Wistar machos, com peso corporal variando entre 200-300g. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os ratos foram acomodados em gaiolas com cinco animais cada, a uma temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Receberam água *ad libitum* e ração sólida padrão para roedores durante todo o experimento.

Os animais foram submetidos à procedimento cirúrgico para instalação de implante em tibia direita e foram separados em dois grupos experimentais de acordo com o medicamento administrado no pós-operatório durante 5 dias, através de gavagem, sendo:

- **Grupo I (Controle):** administração de soro fisiológico.
- **Grupo II (Amirina):** administração de solução de alfa e beta amirina diluída em água destilada, aplicado 5mg/kg.

Em seguida os animais foram submetidos a eutanásia no período de 7 dias.

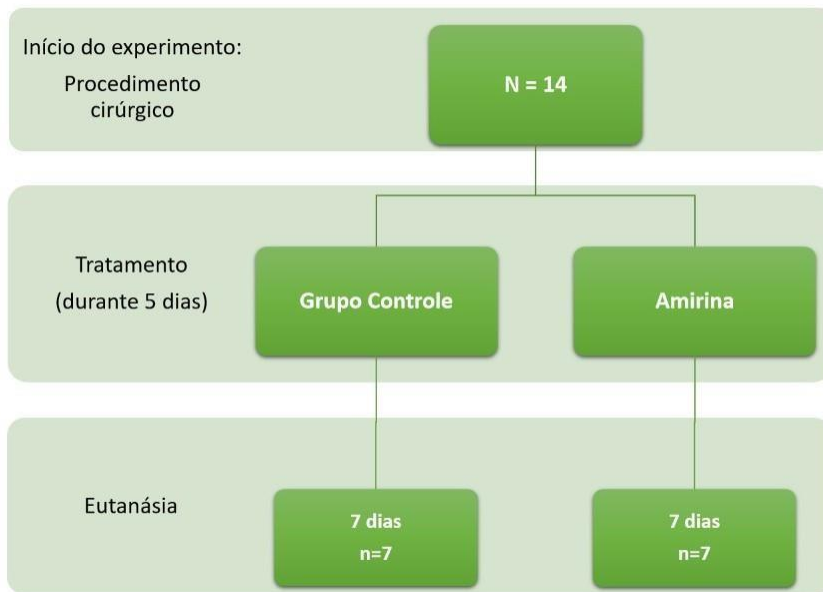


Figura 2: Figura 2: Delineamento Experimental

3.2. OBTENÇÃO DA α E β -AMIRINA EXTRAÍDA RESINA DE *P. HEPTAPHYLLUM* PARA USO SISTÊMICO:

Um total de 6g da mistura da α e β -amirina na forma de pó foi obtida através de uma parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI, que forneceu o material para estudo. A obtenção da mistura de α e β -amirina extraídas da resina de *P. heptaphyllum* foi realizada como descrito anteriormente por Vieira-Júnior et al., 2005. Para administração sistêmica, a mistura foi diluída em água destilada (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo, Brasil).

3.3. CIRURGIA PARA INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES NA TÍBIA:

Foram utilizados implantes de titânio comercial de superfície modificada por subtração ácida de 1,6 de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil) colocado um implante na tíbia direita.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais, foram colocados em Jejum pré-cirúrgico de 12 horas. A anestesia geral foi realizada com Cloridrato de Xilazina (10mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Quetamina (80 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina) aplicados via intramuscular. Após tricotomia e antissepsia da tíbia direita com PVPI 10% degermante e tópico (Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto), foi feita uma incisão dermoperiosteal na face lateral da tíbia direita e realizado o acesso cirúrgico. Após exposição do tecido ósseo, foi realizada osteotomia bicortical com fresa lança de 2mm 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).

O tecido foi suturado por planos usando fio de Poligalactina 910 espessuras 5.0 em plano profundo e com fio de nylon espessura 5.0 em plano superficial.

Ao término das cirurgias, os animais serão mantidos no biotério, com ração e água à vontade.

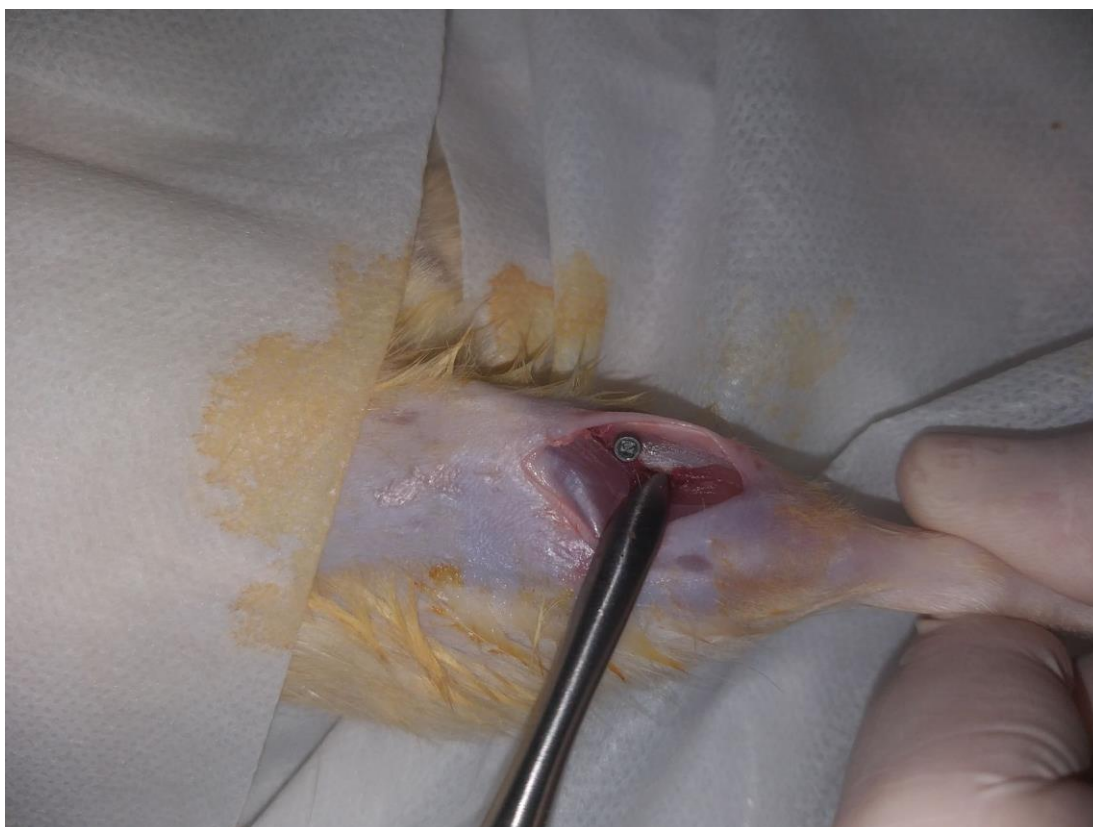


Figura 3: Implante instalado na tíbia de rato

3.4. PERFUSÃO TRANSCARDÍACA:

A eutanásia ocorreu por meio de perfusão transcardíaca, 7 dias após o implante. Para isso os animais foram devidamente anestesiados e colocados em decúbito dorsal. Uma vez acessado o coração foi administrado heparina (0,1ml/5000 U.I/ml) por via intraventricular (ventrículo esquerdo). Após 10 segundos, a cânula da bomba perfusora foi colocada na artéria aorta para a perfusão com 100 ml de solução salina a 0,9%, e posteriormente 300 ml solução de paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em tampão de fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) a 0,1M, pH 7,4 a 4°C.

Após, as tíbias contendo os implantes foram removidas e pós-fixadas na mesma solução a 4°C, durante 24 horas.

Depois da pós-fixação e análise tomográfica, as peças foram lavadas em PBS por 30 minutos e entraram na fase de descalcificação, que foi realizada por meio EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em PBS, por vinte dias e lavadas em PBS durante todo o processo.

3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO:

As peças anatômicas dissecadas, após descalcificação, passaram por desidratação em soluções de alcoóis em concentrações crescentes, diafanizadas em soluções de xilol, com, e seguidamente impregnadas em parafina de baixa fusão (56-58 °C) com três trocas de parafina, de uma hora cada. Os cortes longitudinais de 6µm de espessura no sentido longitudinal foram colocados em banho-maria (40- 50°C) e recolhidos em lâminas silanizadas ou revestidas de poli-L-lisina, sendo três cortes por lâmina com diferença de 40µm entre eles. Os cortes histológicos foram utilizados para a coloração no método de Hematoxilina-eosina (HE). Para coloração com picrocírius red, os cortes em parafina foram colocados em solução de xilol para a desparafinação, e em seguida em solução de álcool em concentrações decrescentes até água, durante meia hora, e as lâminas foram assim coradas por Picrosirius Red.

3.6. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA:

Análises histomorfométricas baseadas em computador foram feitas em um microscópio de luz Aristoplan (Leica - Aristoplan, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha), conectado a um computador permitindo ao observador realizar quantificações através de softwares

diretamente da imagem obtida ao microscópio, em que foi determinada a melhor ampliação para tal mensuração.

A forma de análise dos resultados histológicos para a quantificação das ocorrências histológicas foi atribuída pela análise quantitativa usando grade de Merz para desenho e contagem de pontos contando 100 pontos em cada corte histológico. Sendo que cada lâmina possuía três cortes histológicos, sendo mensurado no total de dez lâminas para cada grupo.

3.6.1. EVENTOS CONSIDERADOS PARA A ANÁLISE DOS RESULTADOS

- 1) Tecido ósseo neoformado
- 2) Tecido ósseo medular neoformado
- 3) Tecido conjuntivo 4) Medula óssea da tíbia

3.6.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir do processamento laboratorial e estabelecimento dos elementos para avaliação, foi realizada a análise estatística descritiva e inferencial. Os dados são apresentados como média, mediana e desvio padrão. Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado 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. RESULTADOS

4.1 COLORAÇÃO HE

A) GRUPO AMIRINA:

Imagem panorâmica (Figura 4A) da área de inserção do implante mostrando as corticais superiores (CS) e corticais inferiores (CI), com as formações teciduais junto

aos vales e espiras do implante e diferenciação celular junto à superfície do implante e à medula óssea (MO). Importante notar áreas de fraturas e desgarramento de fragmentos ósseos (FO) durante o processo de fresagem.

Nas regiões próximas as corticais (Figura 4C) da tíbia observam-se a presença de formação óssea bem distribuídas com células osteoblásticas periféricas em metabolismo de deposição, apresentando trabéculas imaturas e bem irrigadas com grande quantidade de vasos e ausência de infiltrados inflamatórios crônicos ou agudos. Sendo importante notar a ausência de células fibroblásticas e áreas de conjuntivo e ou fibrose.

Nas regiões medulares (Figura 4E) da tíbia apresenta formação óssea bem distribuídas com trabéculas ósseas em formação, celularizadas em intensa proliferação e maturação – áreas de osteócitos e ausência de infiltrados inflamatório.

O padrão de ossificação em ambas as regiões acompanha a superfície do implante com trabéculas ósseas em formação celularizadas e em íntimo contato com o implante mostrando um processo de osseointegração limpo sem infiltrado inflamatório e áreas de fibrose.

B) GRUPO CONTROLE:

Imagem panorâmica da área de inserção do implante (Figura 4B) mostrando as corticais superiores (CS) e corticais inferiores (CI) com formações teciduais junto aos vales e espiras do implante e intensa proliferação e diferenciação celular junto à medula óssea (MO). Nota-se também áreas de desgarramento de fragmentos ósseos (FO) durante o processo de fresagem principalmente nas regiões próximas as corticais.

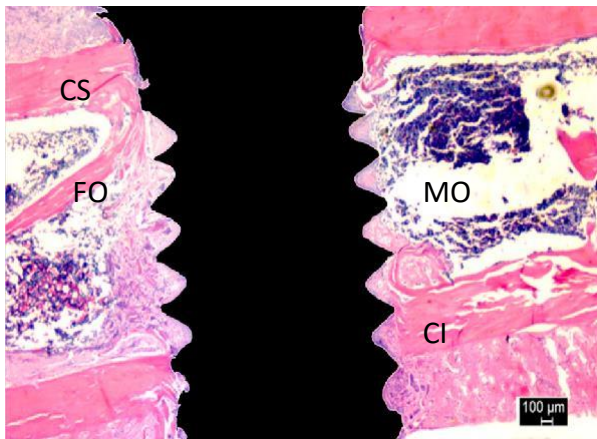
Nas regiões próximas as corticais da tíbia (Figura 4D) observam-se a presença intensa de infiltrado celular com áreas de colagenização intensa e pouca diferenciação osteoblásticas. Nas regiões medulares (Figura 4F) ocorre um quadro de formação óssea não tão organizado com áreas de tecido conjuntivo medular bem vascularizado e finas trabéculas ósseas em organização e pouca diferenciação osteoblásticas em deposição.

Nota-se ainda que em ambas as regiões ocorram o padrão de ossificação acompanhando a superfície do implante com trabéculas ósseas em formação em íntimo contato com o implante mostrando um processo de osseointegração limpo sem infiltrado inflamatório e áreas de fibrose.

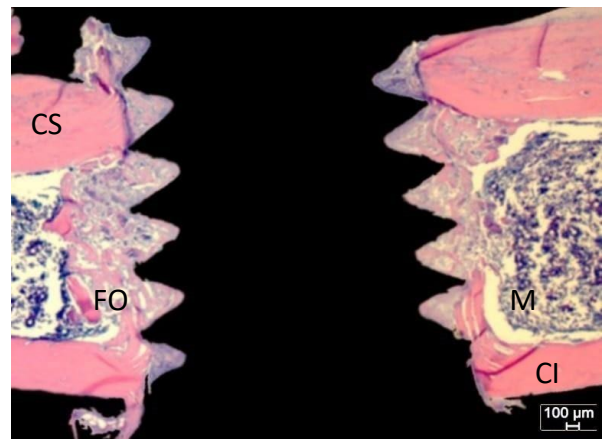
4.1 COLORAÇÃO PICROSIRIUS

Ambos os grupos apresentaram espiras com tecido ósseo imaturo preenchendo os vales e em contato com o implante (Figura 5A e 5B Controle). Nota-se a presença de fragmentos ósseos (FO) corticais residuais do processo de fresagem.

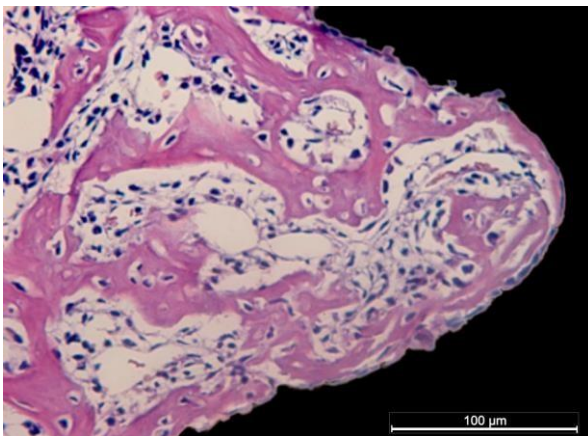
Na Figura 5E (Amirina) e 5F (controle) feita sob luz polarizada nota-se um aspecto da colagenização durante o processo de reparo periimplantar mostrando atividade imatura com intensa deposição fibroblástica e início de formação óssea com fino e esparsos trabeculado ósseo (Figura 5C - Amirina e Figura 5D - Controle)



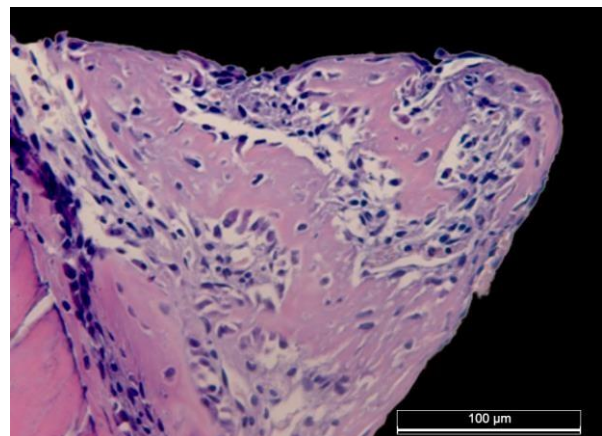
(A) Amirina



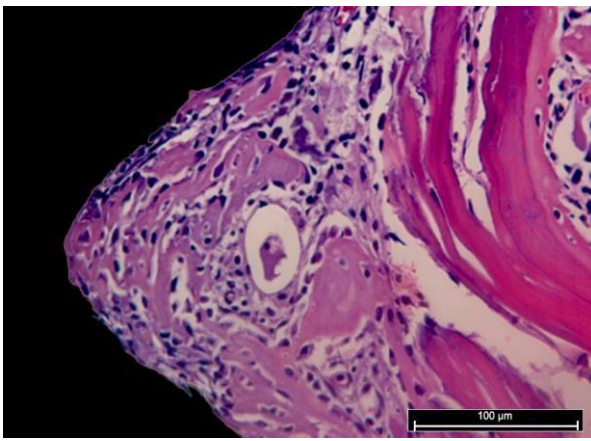
(B) Controle



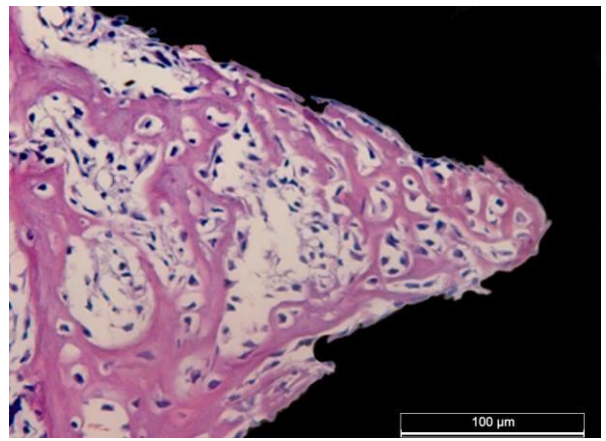
(C) Amirina



(D) Controle

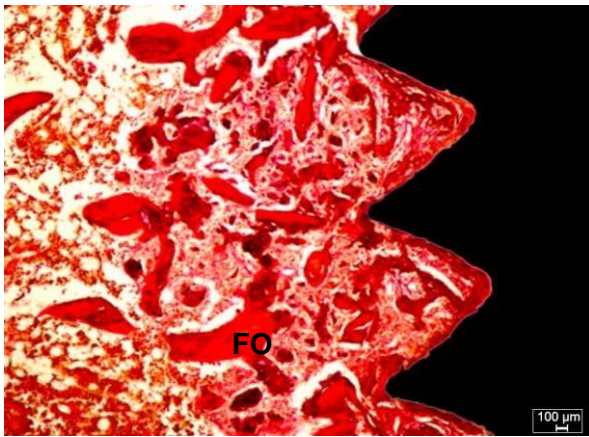


(E) Amirina

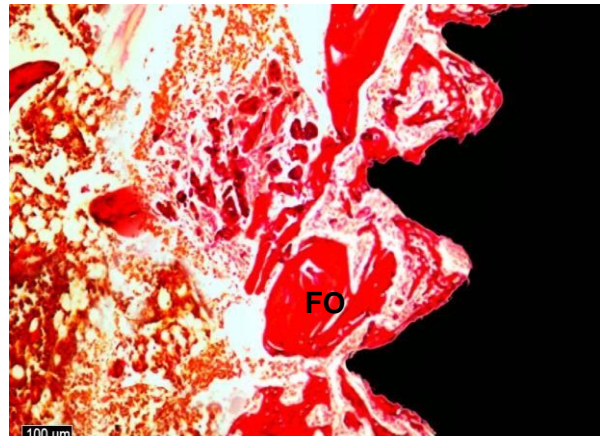


(F) Controle

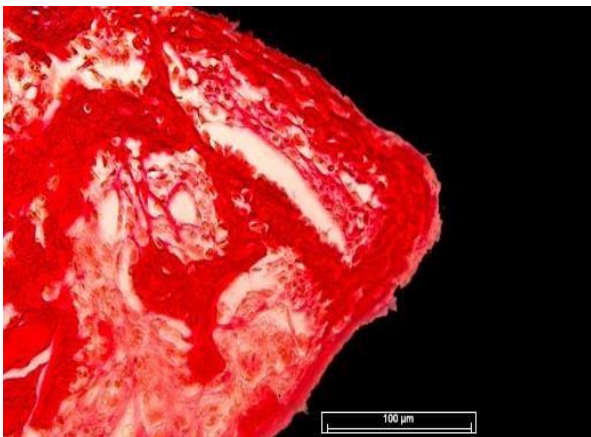
Figura 4: Fotomicrografias de comparação: Grupo Amirina x Grupo Controle. A e B Panorâmicas (Original, 5x), C e D: Região próxima a cortical da Tíbia (Original,40x), E e F: Região próxima a medular da Tíbia (Original,40x).He.



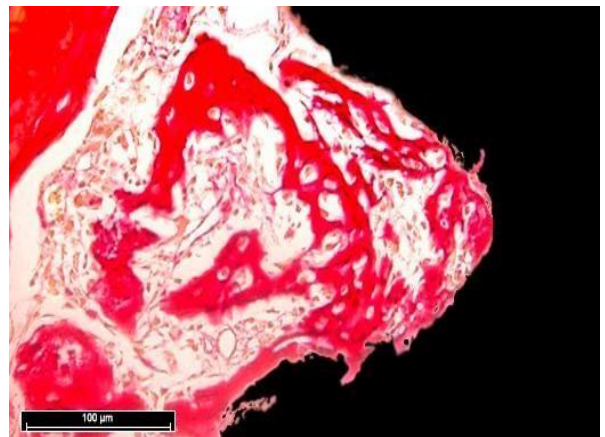
(A) Amirina



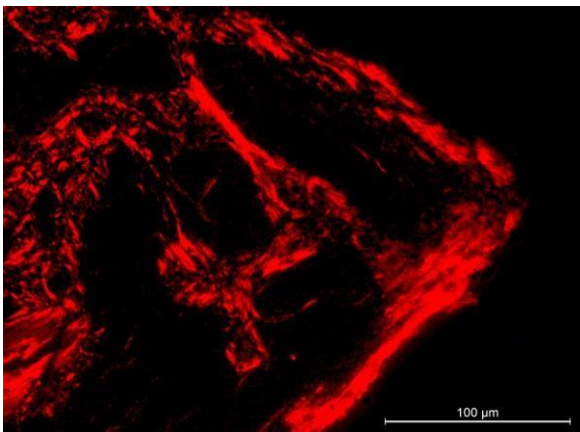
(B) Controle



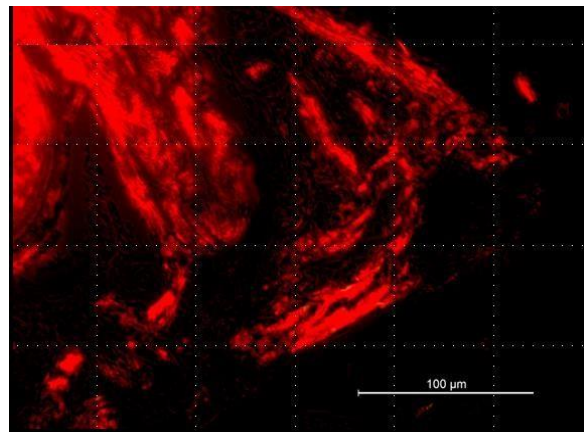
(C) Amirina



(D) Controle



(E) Amirina



(F) Controle

Figura 5: Fotomicrografias de comparação: Grupo Amirina x Grupo Controle. A e B: Região cortical e medular (Original, 10x), C e D: Região próxima a cortical (Original, 40x), E e F: Região próxima a cortical feita sob luz polarizada (Original, 40x). Picro Sirius

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados da análise estatística estão contidos na Tabela 1 – Estatísticas descritiva e na Figura 6.

Tabela 1: Estatísticas descritivas. Valores de média, mediana, desvio padrão para TC, MT, TONM e TONC.

Estadísticas Descriptivas

		Grupos	
		Controle	Amirina
Número de valores		5	5
TC	Média	2,02	2,02
	Mediana	0	0,7
	Desvio Padrão	4,137	3,268
MT	Média	0	0
	Mediana	0	0
	Desvio Padrão	0	0,4472
TONM	Média	11,06	11,4
	Mediana	5,7	7,2
	Desvio Padrão	3,43	2,511
TONC	Média	6,88	6,38
	Mediana	4,7	5
	Desvio Padrão	2,08	1,359

Fonte: Autora

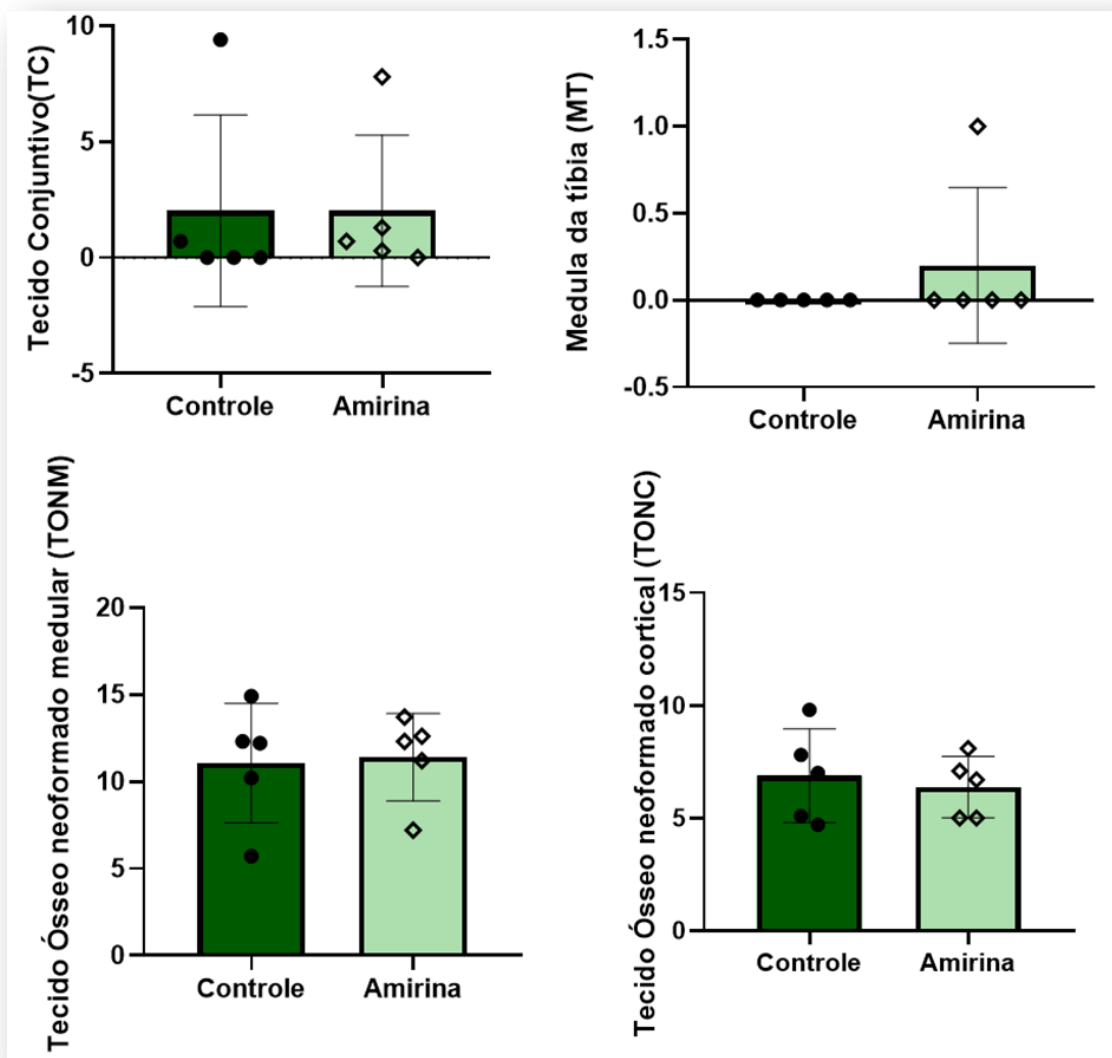


Figura 6: Gráfico comparando os grupos controle e amirina em relação a MT (A), TC(B), TONM(C), TONC(D) [Todos os parâmetros não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$)

6. DISCUSSÃO

Durante o processo de osseointegração, nas primeiras duas horas de cicatrização do conjunto osso-implante existe o preenchimento das roscas do implante pelo coágulo sanguíneo no qual ocorre formação de uma rede de fibrina composta por hemácias, neutrófilos e monócitos/macrófagos. Quatro dias após inicia a fase de fibroplastia, caracterizada pelo surgimento de vasos sanguíneos, a migração de leucócitos e células mesenquimais, sendo o coágulo substituído por tecido de granulação (ABRAHAMSSON et al., 2004; SCHROEDER et al., 1981).

Com a migração contínua das células mesenquimais há a substituição do tecido de granulação por um tecido conjuntivo provisório, o qual é rico em vasos, células mesenquimais, fibras e estruturas vasculares neoformadas.

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 ser 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 (Dimitriou,2011; Chen,2019; Terheyden,2012).

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. (Mistry,2016; Witek 2020; Perrotti,2011)

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 serem a condição clínica, ao extrapolar-se para a clínica, mais encontrada em implantodontia (Bondarenko,2018; Witek,2020; Mistry,2016)

Baseado nestas características celulares, durante o processo de remoção do implante no processamento histológico é de grande preocupação a preservação da região em íntimo contato com o implante, já que o tecido é ainda imaturo. Contudo, observa-se que em ambos os grupos experimentais as regiões de espiras e vales estão bem delimitadas e preservadas mesmo com a remoção dos implantes.

A modificação fisiológica ocorrida pela presença circulante da medicação utilizada neste estudo evidenciou que o tratamento com a alfa e beta amirina está relacionado à melhora discreta de alguns parâmetros da qualidade óssea relacionados ao sucesso da osseointegração, principalmente no quesito organização celular do tecido ósseo neoformado e diminuta presença de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório para um período de 7 dias.

A neoformação óssea pôde ser observada entre a primeira e segunda semana de cicatrização observada em ambos os grupos nas quais ocorrem a diferenciação

óssea junto a medula óssea da tíbia que são estimulada pelas presenças do implante no ato de fresagem e suas esquirolas e fragmentos da cortical óssea e da diferenciação e substituição do coágulo local.

As espiras e vales estão em delimitados e preservados mesmo com a remoção dos implantes. Ambos os grupos respondem de forma semelhante do ponto de vista qualitativo, diferenciação óssea sem infiltrado inflamatório e ou áreas de agudizações.

O tecido de granulação formado preenche o espaço entre o implante e o sítio cirúrgico e funciona como um tecido conjuntivo de suporte pré-osteoblástico (Mouraret, 2014, Taddei, 2012) em tempos iniciais, denominado neste estudo como medula óssea neoformada, demonstra ainda uma tendência a organização das fibras colágenas e presença da ossificação endocondral.

Além de conter muitas espículas de tecido ósseo neoformado o que sugere um adiantamento no processo de reparo no grupo experimental.

Sendo necessário também pensar no modelo animal se o uso dessa classe de medicamentos influencia de fato no tratamento de pacientes, devido as limitações do presente estudo, sendo necessários portanto a validação por testes pré-clínicos.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, o grupo amirina apresentou comportamento muito próximo ao do grupo controle, com tendência numérica a neoformação óssea em período precoce, permitindo que a osseointegração ocorra discretamente mais rápida. Contudo, existe a necessidade de mais estudos que utilizem diferentes concentrações da medicação e períodos experimentais.

8. REFERÊNCIAS

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral Implant Surfaces: **Part 1-Review Focusing on Topographic and Chemical Properties of Different Surfaces and in Vivo Responses to Them**. Int J Prosthodont 2004; 17 (5): 536-543;

Allen MR. **The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing**. Odontology. 2011 Jan;99(1):8-17;

Almeida P, et al. **Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from Protium paniculatum oil-resins.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2015;

Aragão GF, et al. **A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-and beta-amyrin from Protium heptaphyllum (Aubl.)**
March. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006;

Aragão GF, et al. **Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α -and β -amyrin from Protium heptaphyllum.** Pharmaceutical biology, v. 53, n. 3, p. 407-413, 2015;

Aragão GF, et al. **Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyrin from Protium heptaphyllum (Aubl.)**
march. Journal of herbal pharmacotherapy, v. 7, n. 2, p. 31-47, 2008;

Aragão GF, et al. **Antiplatelet Activity of α -and β -Amyrin, Isomeric Mixture from Protium heptaphyllum.** Pharmaceutical biology, v. 45, n. 5, p. 343-349, 2007;

Ballo AM, Cekic-Nagas I, Ergun G, Lassila L, Palmquist A, Borchardt P, Lausmaa J, Thomsen P, Vallittu PK, Närhi TO. **Osseointegration of fiber-reinforced composite implants: histological and ultrastructural observations.** Dent Mater. 2014 Dec;30(12):e 38495;

Bondarenko S, Dedukh N, Filipenko V, Akonjom M, Badnaoui AA, Schwarzkopf R. **Comparative analysis of osseointegration in various types of acetabular implant materials.** Hip Int. 2018 Nov;28(6):622-628;

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. **Bisphosphonates and dental implants: A meta-analysis.** Quintessence Int. 2016 Apr;47(4):329-42;

Chen YF, Cao J. **Analysis of Pelvic Fracture Healing Status in 198 Cases.** Fa Yi Xue Za Zhi. 2019 Jun;35(3):349-352;

Díaz-ruiz G, et al. **Growth inhibition of Streptococcus from the oral cavity by α -amyryn esters.** Molecules, v. 17, n. 11, p. 12603-12611, 2012;

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. **Bone regeneration: current concepts and future directions.** BMC Med. 2011 May 31;9:66.

Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y. **Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats.** Clin Oral Implants Res. 2009 Feb;20(2):145-50;

Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F, et al. **Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants.** J Pineal Res.

2009;47(2):164–172;

Gómez-Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Boquete-Castro A, Guardia J, Piattelli A, Perrotti V, et al. **Outcomes of topical applications of melatonin in implant dentistry: a systematic review.** Implant Dent. 2015;24(1):25–30;

Lima EM, et al. **Triterpenes from the Protium heptaphyllum resin-chemical composition and cytotoxicity.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 24, n. 4, p. 399-407, 2014;

MELO CM, ET AL. **ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF A, B-AMYRIN, A TRITERPENE FROM PROTIUM HEPTAPHYLLUM, ON CERULEIN-INDUCED ACUTE PANCREATITIS IN**

mice. Inflammation research, v. 60, n. 7, p. 673-681, 2011;

Mistry S, Roy S, Jyoti Maitra N, Roy R, Datta S, Chanda A, Sarkar S. **Safety and efficacy of additive and subtractive surface modification of Ti6Al4V endosseous implant in goat bone.** J Mech Behav Biomed Mater. 2016 Apr; 57:69- 87;

Mouraret S, Hunter DJ, Bardet C, Brunski JB, Bouchard P, Helms JA. **A pre-clinical murine model of oral implant osseointegration.** Bone. 2014;58:177-84;

OKOYE NN, ET AL. **BETA-AMYRIN AND ALPHA-AMYRIN ACETATE ISOLATED FROM THE STEM BARK OF ALSTONIA BOONEI DISPLAY PROFOUND ANTI-INFLAMMATORY**

activity. Pharmaceutical biology, v. 52, n. 11, p. 1478-1486, 2014;

Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, Okamoto R. **Short term sodium alendronate administration improves the peri- implant bone quality in osteoporotic animals.** J Appl Oral Sci. 2017 Jan- Feb;25(1):42-52;

Ouanounou A, Hassanpour S, Glogauer M. **The influence of systemic medications on osseointegration of dental implants.** J Can Dent Assoc. 2016 Apr; 82:g7;

Perrotti V, Aprile G, Degidi M, Piattelli A, Iezzi G. **Fractal analysis: a novel method to assess roughness organization of implant surface topography.** Int J Periodontics Restorative Dent. 2011 Nov-Dec;31(6):633-9;

PINTO SAH, ET AL. **ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF A, B-AMYRIN, A PENTACYCLIC TRITERPENE FROM PROTIUM HEPTAPHYLLUM IN RAT MODEL OF ACUTE**

periodontitis. Inflammopharmacology, v. 16, n. 1, p. 48-52, 2008;

Pinto SAH, et al. **Antinoceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin.** Phytomedicine, v. 15, n. 8, p. 630-634, 2008;

Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.

Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília; Ministério da Saúde, 2015;

Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, de-Val JE, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Pardo-Zamora G, et al. **Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae.** Clin Oral Investig. 2013;17(1):147–158;

Santos FA, et al. **Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from Protium heptaphyllum in mice.** Lipids in Health and Disease, v. 11, n. 1, p. 98, 2012;

Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. **The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces.** J Maxillofac Surg. 1981 Feb;9(1):15-25; Soldi C, et al. **Synthetic derivatives of the α -and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties.** Bioorganic & medicinal chemistry, v. 16, n. 6, p. 3377- 3386, 2008;

Taddei SR, Moura AP, Andrade I Jr, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira MM.

Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. **J Biomech.**

2012;45(16):2729-35;

Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. **Osseointegration-- communication of cells.** Clin Oral Implants Res. 2012 Oct;23(10):1127-35;

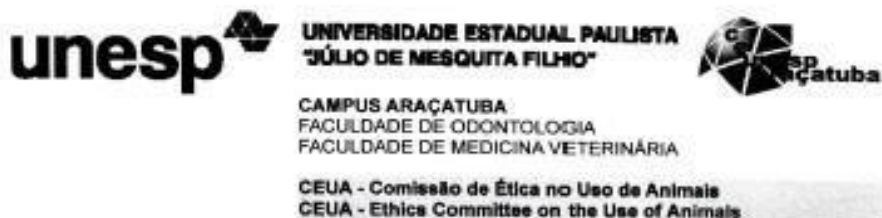
Vieira-Júnior GMV; De Souza CML; Chaves MH. **Resina de Protium heptaphyllum: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas.** Quim. Nova, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005;

Watts NB. **Long-term risks of bisphosphonate therapy.** Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014 Jul;58(5):523-9;

Witek L, Tovar N, Lopez CD, Morcos J, Bowers M, Petrova RS, Coelho PG. **Assessing osseointegration of metallic implants with boronized surface treatment.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2020 May 1;25(3):e311-e317.

ANEXOS

Anexo A



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Uso da alfa e beta amirina no tratamento de superfície em reimplante dentário imediato**", Processo FOA nº 00467-2018, sob responsabilidade de Daniela Atili Brandini de Weert apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 20 de Julho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Abril de 2020.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Maio de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Use of alfa and beta amirin in surface treatment in immediate dental replantation**", Protocol FOA nº 00467-2018, under the supervision of Daniela Atili Brandini de Weert presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 20, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: Abril 20, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 20, 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 (18) 3636-3234 - Email CEUA: ceua@fos.unesp.br

MARÍLIA - SP

2023