



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – IMPLANTODONTIA**

JOSÉ MOISÉS DE SOUZA JÚNIOR

**O EFEITO DOS EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA E
SEMENTE DE TORANJA NA CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR**

**FLORIANÓPOLIS, SC
FEVEREIRO DE 2017**

JOSÉ MOISÉS DE SOUZA JÚNIOR

O EFEITO DOS EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA E SEMENTE
DE TORANJA NA CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini

Florianópolis, SC
Fevereiro de 2017

JOSÉ MOISÉS DE SOUZA JUNIOR

O EFEITO DOS EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA E SEMENTE DE TORANJA NA CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 09 de fevereiro de 2017.

Prof^ª. Dr^ª. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do curso

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini
Presidente da Banca Examinadora - Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Almeida Miguez
Membro

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Membro

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Santos Zimmermann
Membro

Prof. Dr. Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto
Membro

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Membro

Prof. Dr. João Gustavo Oliveira de Souza
Membro suplente

“Quando eu era menino, falava como menino, pensava como menino e raciocinava como menino. Quando me tornei homem, deixei para trás as coisas de menino.”

1 Coríntios 13:11

DEDICATÓRIA

À minha linda esposa Bibiana, que sempre me deu forças para buscar meus sonhos e objetivos de vida. Todos os momentos que vivemos juntos são fontes de inspiração e aprendizado. Essa realização é mais uma pedra da vida que estamos construindo juntos. E que cada vez tenhamos um novo projeto. Te amo do fundo do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde para poder seguir meus passos e buscar a realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Moisés e Sueli, que sempre me deram a oportunidade de investir na minha formação acadêmica e que sempre prezaram pelos meus estudos. Vocês são o maior exemplo de casal da minha vida amorosa.

Às minhas irmãs Thaisa, Michely e Joseany por serem as primeiras e maiores amigas da minha vida. Hoje cada um com a sua própria família, mas quando estamos juntos o sentimento é muito bom e verdadeiro. Amo vocês e suas famílias.

Ao meu orientador de todo processo da minha pós graduação Marco Aurélio Bianchini, que sempre foi um grande líder durante toda essa caminhada. Sempre me puxou para o caminho certo e incentivou nos meus estudos. Agradeço imensamente a oportunidade de poder realizar todos os projetos que desenvolvemos juntos.

Aos professores Antonio Carlos Cardoso, Ricardo de Souza Magini, Gláucia Santos Zimmermann e César Augusto Magalhães Benfatti, que sempre foram muito solícitos e me ajudaram em todos os momentos dos estudos no CEPID. Cada um, na sua personalidade acrescentou muito para minha formação.

Ao amigo e colega de profissão Wilson Andriani Junior, o famoso Titi, por ser um grande exemplo de profissional. Uma grande amostra de dedicação e amor a Odontologia.

A professora Patricia Almeida Míguez por dar início a essa linha de pesquisa e me oportunizar a desenvolver e realizar essa pesquisa juntamente com sua equipe na Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill – EUA. Sua dedicação a esse projeto é fantástica.

Aos sensacionais amigos Felipe Damerou Ouriques e Bruna Barbosa Corrêa pelo enorme companheirismo na realização desse projeto. Vocês foram incansáveis na execução desse projeto. Espero que vocês tenham aprendido e gostado da nossa parceria o tanto quanto

tive o prazer de compartilhar esses momentos com vocês.

Aos colegas de pós graduação João Gustavo Oliveira de Souza e Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto, por serem os melhores parceiros de estudo que se possa ter.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo nessa caminhada acadêmica e que juntos vivemos grandes momentos.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por nos últimos 12 anos ter sido como uma casa. Local que aprendi e desenvolvi a profissão que escolhi para minha vida. Após todo esse tempo fico muito contente de ter feito essa escolha e por tudo que ela me proporcionou.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	19
CAPÍTULO II.....	21
Introdução expandida.....	21
CAPÍTULO III.....	25
Artigo.....	25
CAPÍTULO IV.....	59
Bibliografia consultada.....	59
CAPÍTULO V.....	65
Metodologia expandida.....	65
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	73
Parecer consubstanciado da CONEP.....	76
Produção científica durante o doutorado.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fold change do fator TGF- β 1. Teste <i>t</i> mostrou diferença de GTO em relação a CON e GEU.....	40
Figura 2:	Fold change do fator PDGF. GEU e GTO significante om correção Bonferroni. CON e GTO diferente com teste <i>t</i>	41
Figura 3:	Fold change do fator CXCL2. CON e GTO significantes com correção Bonferroni.....	41
Figura 4:	Fold change do fator IL-6. CON e GTO significantes com correção Bonferroni. GEU e GTO diferente com teste <i>t</i>	42
Figura 5:	Fold change do fator IL-1 β . GEU e GTO significante com correção Bonferroni.....	42
Figura 6:	Fold change do fator VWF. GEU e GTO significante com correção Bonferroni. CON e GEU diferente com teste <i>t</i>	43
Figura 7:	Avaliação da área óssea nas lâminas de H&E. CON e GEU diferente estatisticamente com teste <i>t</i>	44
Figura 8:	Análise qualitativa das amostra coradas em H&E com aumento 4x.....	45
Figura 9:	Distribuição do sinal das cores nas lâminas de PSR. Sem diferença estatística.....	46
Figura 10:	Análise qualitativa das amostra coradas com PSR com aumento 4x.....	47
Figura 11:	Contagem de osteoclastos nas lâminas de TRAP. GEU e GTO diferente estatisticamente com teste <i>t</i>	48

CAPÍTULO I

SOUZA-JUNIOR, J. M. O efeito dos extratos de semente de uva e semente de toranja na cicatrização alveolar. 2017. 88f. Tese (Doutorado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Objetivos: Produtos naturais podem levar a alterações nos parâmetros dos tecidos moles e mineralizados, devido ao seu efeito sobre as células e matriz extracelular. Foram investigados os efeitos de dois suplementos dietéticos nos fatores de crescimento, inflamatórios e de coagulação e também o osso recém-formado em alvéolo de extração de humanos.

Métodos: Este estudo teve aprovação institucional para pesquisa em seres humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Os indivíduos tomaram 300 mg 3 vezes ao dia de extrato de semente de uva [GEU] ou extrato de semente de toranja [GTO], iniciando duas semanas antes da extração dentária e mantendo esse regime por sessenta dias (n = 10 por grupo). Dentes com indicação de extração foram removidos e os alvéolos preenchidos com uma esponja de colágeno e suturados. Após 24 h, recolheu-se uma amostra do alvéolo, extraiu-se RNA com TRIzol e converteu-se em cDNA. Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR) foi realizada para TGF β -1, VEGF, PDGF, BMP-4, BMP-7, RUNX-2, IL1- β , CXCL2, IL-6, VWF e F2 trombina. Sessenta dias após a extração do dente, foi obtido uma amostra óssea do local antes da colocação do implante dentário, fixado em formalina tamponada a 10% e desmineralizado por EDTA 0,5 M com pH 7,6. As amostras foram incorporadas em parafina, seccionadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E) para morfologia, picrosirius red (PSR) para avaliar a organização/maturação de colágeno e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para contagem de osteoclastos.

Resultados: qRT-PCR revelou que o grupo GTO apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nos fatores de crescimento TGF β -1 e PDGF e nos marcadores inflamatórios IL1- β , CXCL2 e IL-6. GEU mostrou um aumento no fator de coagulação VWF. As análises histológicas mostraram uma clara diminuição da densidade do colágeno, maturação óssea, densidade osteoclástica aumentada e presença abundante de plaquetas e tecido conjuntivo frouxo no grupo GEU.

Conclusão: Houve um impacto significativo de suplementos dietéticos

específicos na cicatrização de alvéolos de extração com diminuição dos marcadores inflamatórios em GTO e formação óssea atrasada observada em GEU. São necessários outros estudos nesta linha de pesquisa, para que se possa compreender adequadamente as modificações que ocorrem nos alvéolos de extração em pacientes que fazem o uso de suplementos alimentares.

Palavras-chave: cicatrização óssea, alvéolo de extração, regeneração óssea, dieta.

SOUZA-JUNIOR, J. M. Effect of natural compounds on bone regeneration: study in humans. 2017. 88f. Tese (Doutorado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Objectives: Natural products could lead to altered soft and mineralized tissue parameters due to their effect on cells and extracellular matrix. We investigated the effects of two dietary supplements on growth, inflammatory and coagulation factors and newly formed bone in extraction sockets in humans. **Methods:** This study had institutional approval for human subjects research from the Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Subjects took 300 mg t.i.d. of Grape Seed Extract [GEU] or Grapefruit Seed Extract [GTO] starting two weeks prior to dental extraction and maintained this regimen for sixty days (n=10 per group). Non-restorable teeth were extracted and sockets filled with a commercially available collagen patch and sutured. After 24 h, a socket sample was collected, RNA extracted with TRIzol and converted into cDNA. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed for TGF β -1, VEGF, PDGF, BMP-4, BMP-7, RUNX-2, IL1- β , CXCL2, IL-6, VWF and thrombin. Sixty days after tooth extraction, a central core was obtained from the site prior to dental implant placement, fixed in 10% buffered formalin and demineralized by 0.5 M EDTA pH 7.6. Samples were embedded in paraffin, sectioned and stained in hematoxylin and eosin (H&E) for morphology, picosirius red (PSR) for evaluation of the organization/maturation of collagen and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclast count.

Results: qRT-PCR revealed that the GTO group had a statistically significant decrease in the growth factors TGF β -1 and PDGF and in the inflammatory markers IL1- β , CXCL2 e IL-6. GEU showed an increase in the coagulation factor VWF. Histological analyses showed a clear decrease in collagen density, bone maturation, increased osteoclast density and abundant presence of platelets and loose connective tissue in GEU group.

Conclusions: There was a significant impact of specific dietary supplements in healing of extraction sockets with decreased inflammatory markers with GTO and delayed bone formation observed with GEU. Further studies are needed in this line of research to adequately understand the changes occurring in extraction sockets in patients using dietary supplements.

Keywords: bone healing, extraction socket, bone regeneration, dietary.

CAPÍTULO II

Introdução expandida

Cicatrização alveolar:

A cicatrização do alvéolo após a extração dental é um evento que busca o interesse de pesquisadores e seus eventos vem sendo descritos frequentemente na literatura científica. A razão principal disso é em função das alterações que ocorrem no processo alveolar que podem evitar ou tornar difícil a instalação do implante dentário em posição ideal para a reabilitação protética (1). Além disso, a alta demanda por estética na odontologia, ressalta a importância da manutenção do rebordo alveolar para se manter uma prótese implantossuportada estética a longo prazo. É esperado que com a cicatrização alveolar, resulta-se em um rebordo alveolar com volume de tecido ósseo que permita a instalação ideal de um implante. Cicatrização alveolar são as mudanças após a perda dental, que são alterações locais que promovem alterações nos tecidos duros e moles, afim de fechar a ferida e restaurar a homeostase do tecido (2).

A região anterior maxilar apresenta paredes de alvéolo finas, frequentemente formadas somente por osso fasciculado. Esse é dependente do dente e sua estrutura é reabsorvida gradualmente após a exodontia. O processo de cicatrização resulta uma grande reabsorção da parede vestibular do alvéolo e menos pronunciada na parede lingual. Essas alterações acontecem logo nos primeiros 3 meses após a extração dental (3,4). A elevação de retalho também causa danos locais, devido ao rompimento vascular, mas essa cicatrização é semelhante quando não há descolamento do retalho quando avaliado a longo prazo (5).

Fatores de crescimento:

As respostas de cicatrização iniciais numa ferida são reguladas por fatores de crescimento, que são moléculas de sinalização, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), proteína óssea morfogenética 4 (BMP-4) e proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7) entre outras. Eles iniciam a migração celular, diferenciação e proliferação à medida que interagem umas às outras. Esses atuam como sinais mitogênicos e angiogênicos na fase inicial da cicatrização óssea (2). A localização espacial e as variações temporais destes fatores de

crescimento na cicatrização alveolar após extração dental correlacionaram-se com os eventos histológicos de cicatrização e seguiram as funções biológicas conhecidas destes fatores de crescimento (6).

Alguns estudos vem estudado o efeito dos fatores de crescimento na cicatrização óssea. Diversas substâncias foram testadas visando melhorar a disposição dos fatores de crescimento, que regulam remodelação, inflamação e quimiotaxia de tecidos (6–12).

Proantocianidinas (PA) X fatores de crescimento:

Nos últimos anos verificou-se um interesse crescente no uso de botânicos naturalmente disponíveis como agentes quimiopreventivos ou quimioterapêuticos para algumas doenças. Uma dessas é opções, é o extrato de semente de uva que contém lipídios, proteínas, carboidratos e polifenóis. Proantocianidinas são os compostos fenólicos mais abundantes nas sementes de uva. O extrato de PA de semente de uva tem uma atividade antioxidante mais poderosa do que outros antioxidantes bem conhecidos, incluindo vitamina C, vitamina E e ácido gálico. PA tem várias funções biológicas, tais como antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico e ações vasodilatadoras (13–15).

Pouco se sabe sobre os efeitos da PA regeneração óssea de processos alveolares, contudo estudos em ratos, já avaliaram os seus efeitos em fatores de crescimento específicos, como um estudo que mostrou que a utilização sistêmica de PA aumentou a expressão de BMP-7 quando testado com RT-PCR (16) no tratamento de diabetes. PA foi utilizado para tratamento de artrite reumatoide e o grupo teste demonstrou diminuição na expressão de IL-17 (14). Outro estudo também mostrou a diminuição da expressão de interleucina quando submetidos a uma dieta rica em PA para tratamento de asma alérgica (15). Ratos tratados com PA mostraram uma diminuição da expressão de IL-4, IL-5, IL-13, VEGFA e TGF- β 1 nos modelos de asma aguda e crônica (17,18).

Naringenina e Hesperidina (NA e HE) X fatores de crescimento:

Naringenina e hesperidina são compostos flavonóides encontrados abundantemente na casca de frutas cítricas. Estudos tem relatado que esses compostos foram investigados pelas suas atividades farmacológicas, incluindo efeitos anti-tumorais, anti-oxidante, anti-inflamatórios, anti-virais e antidiabéticos (19,20).

Estudo que avaliou o uso de HE em ratos para tratamento de artrite reumatoide, tiveram melhores resultados quando comparada com o grupo controle negativo (21). Outro estudo em ratos, que foram testados quanto ao tratamento para fibrose hepática, tiveram bons resultados com o TGF- β 1 e CTGF (22). Em um modelo semelhante, que também tratou fibrose hepática em ratos, HE inibiu a proliferação e ativação de PDGF (19). Ratos tratados com NA apresentaram níveis mais baixos de IL-4 e IL-13 no tratamento para asma (23). Células pancreáticas tratadas com NA tiveram uma diminuição de TGF- β 1 quando testadas ao seu potencial cancerígeno (24). Ratos tratados com NA demonstraram uma diminuição de TGF- β 1 quando testados em relação a doença renal (20,25,26). NA inibiu danos a ratos induzida pela radiação UVB, com redução de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α e TGF- β 1 (27,28). Os níveis de expressão de IL-6 foram significativamente mais baixos no tecido adiposo perigonadal de ratos suplementados com NA (29). O uso de NA sobre neuropatia diabética induzida experimentalmente em ratos, demonstrou uma diminuição de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (30). Ratos tratados com NA demonstraram uma redução da secreção de TGF- β 1 a partir de células de câncer de mama (31).

Proantocianidinas (PA) X cicatrização óssea:

Os efeitos esqueléticos da PA, particularmente os exercidos durante o período crítico de crescimento e desenvolvimento que demonstram uma elevada taxa de formação óssea, não são conhecidos. Foi investigado o uso de PA sobre a formação óssea examinando massa óssea total e cortical, densidade, arquitetura e força não invasiva usando cêndilos mandibulares de ratos com restrição de cálcio e os resultados sugerem que o tratamento com PA aumentaria tanto a massa óssea como a resistência óssea nos cêndilos mandibulares dos ratos (32–36). Também foi estudado os efeitos da PA na diáfise do osso tibial em ratos com baixo teor de cálcio e o resultado sugere que a PA incluída em uma mistura de dieta com cálcio tem um efeito benéfico na formação óssea e na resistência óssea (37). PA foi utilizado no tratamento de artrite óssea da articulação do joelho do rato e protegeu contra maiores danos nas articulações (38). Importante estudo que avaliou em ratos o efeito de PA na artrite reumatoide e seu uso melhorou as manifestações da artrite ao suprimir simultaneamente a diferenciação dos osteoclastos e promover a diferenciação dos osteoblastos (39). Em um estudo de cultura de células foi investigado se PA exerce um efeito anti-apoptose em células

osteoblásticas, através de sua atividade antioxidante e os resultados foram positivos quanto a sua utilização (40). Outro estudo demonstrou os efeitos da PA na prevenção de osteonecrose induzida por corticosteróide em coelhos e os resultados revelaram que o tratamento com PA poderia inibir o dano oxidativo e a apoptose por exercer efeitos benéficos na redução da incidência de osteonecrose (41).

Naringenina e Hesperidina (NA e HE) X cicatrização óssea:

Em estudo de cultura de osteoblastos foi examinado a capacidade da HE para afetar a proliferação, diferenciação e mineralização de osteoblastos primários de roedores e os resultados sugerem que HE pode regular a diferenciação de osteoblastos (42,43). O efeito de HE e NA, duas flavonoides cítricas principais, na regulação do metabolismo ósseo foi examinado em ratos e os resultados demonstraram que essas substâncias protegem contra a perda óssea em ratos, agindo principalmente através da inibição da reabsorção óssea. HE se demonstrou mais eficaz do que NA apesar da sua menor biodisponibilidade (44). Outros trabalhos tiveram como objetivo examinar se HE inibe a perda óssea em ratos e os resultados indicaram que HE inibiu a reabsorção e hiperlipidemia óssea (45–48).

CAPÍTULO III

Artigo

O EFEITO DOS EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA E SEMENTE DE TORANJA NA CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR

Autores

- José Moisés de Souza Júnior
- João Gustavo Oliveira de Souza
- Stephen Alexander Tuin
- Adam Robinson
- Patricia Almeida Miguez
- Marco Aurélio Bianchini

Florianópolis, SC
Fevereiro de 2017

Resumo

Objetivos: Produtos naturais podem levar a alterações nos parâmetros dos tecidos moles e mineralizados, devido ao seu efeito sobre as células e matriz extracelular. Foram investigados os efeitos de dois suplementos dietéticos nos fatores de crescimento, inflamatórios e de coagulação e também o osso recém-formado em alvéolo de extração de humanos.

Métodos: Este estudo teve aprovação institucional para pesquisa em seres humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Os indivíduos tomaram 300 mg 3 vezes ao dia de extrato de semente de uva [GEU] ou extrato de semente de toranja [GTO], iniciando duas semanas antes da extração dentária e mantendo esse regime por sessenta dias (n = 10 por grupo). Dentes com indicação de extração foram removidos e os alvéolos preenchidos com uma esponja de colágeno e suturados. Após 24 h, recolheu-se uma amostra do alvéolo, extraiu-se RNA com TRIzol e converteu-se em cDNA. Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR) foi realizada para TGF β -1, VEGF, PDGF, BMP-4, BMP-7, RUNX-2, IL1- β , CXCL2, IL-6, VWF e F2 trombina. Sessenta dias após a extração do dente, foi obtido uma amostra óssea do local antes da colocação do implante dentário, fixado em formalina tamponada a 10% e desmineralizado por EDTA 0,5 M com pH 7,6. As amostras foram incorporadas em parafina, seccionadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E) para morfologia,

picrosirius red (PSR) para avaliar a organização/maturação de colágeno e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para contagem de osteoclastos.

Resultados: qRT-PCR revelou que o grupo GTO apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nos fatores de crescimento TGF β -1 e PDGF e nos marcadores inflamatórios IL1- β , CXCL2 e IL-6. GEU mostrou um aumento no fator de coagulação VWF. As análises histológicas mostraram uma clara diminuição da densidade do colágeno, maturação óssea, densidade osteoclástica aumentada e presença abundante de plaquetas e tecido conjuntivo frouxo no grupo GEU.

Conclusão: Houve um impacto significativo de suplementos dietéticos específicos na cicatrização de alvéolos de extração com diminuição dos marcadores inflamatórios em GTO e formação óssea atrasada observada em GEU. São necessários outros estudos nesta linha de pesquisa, para que se possa compreender adequadamente as modificações que ocorrem nos alvéolos de extração em pacientes que fazem o uso de suplementos alimentares.

Palavras-chave: cicatrização óssea, alvéolo de extração, regeneração óssea, dieta.

Abstract

Objectives: Natural products could lead to altered soft and mineralized tissue parameters due to their effect on cells and extracellular matrix. We investigated the effects of two dietary supplements on growth, inflammatory and coagulation factors and newly formed bone in extraction sockets in humans. Methods: This study had institutional approval for human subjects research from the Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Subjects took 300 mg t.i.d. of Grape Seed Extract [GEU] or Grapefruit Seed Extract [GTO] starting two weeks prior to dental extraction and maintained this regimen for sixty days (n=10 per group). Non-restorable teeth were extracted and sockets filled with a commercially available collagen patch and sutured. After 24 h, a socket sample was collected, RNA extracted with TRIzol and converted into cDNA. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed for TGF β -1, VEGF, PDGF, BMP-4, BMP-7, RUNX-2, IL1- β , CXCL2, IL-6, VWF and thrombin. Sixty days after tooth extraction, a central core was obtained from the site prior to dental implant placement, fixed in 10% buffered formalin and demineralized by 0.5 M EDTA pH 7.6. Samples were embedded in paraffin, sectioned and stained in

hematoxylin and eosin (H&E) for morphology, picrosirius red (PSR) for evaluation of the organization/maturation of collagen and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclast count.

Results: qRT-PCR revealed that the GTO group had a statistically significant decrease in the growth factors TGF β -1 and PDGF and in the inflammatory markers IL1- β , CXCL2 e IL-6. GEU showed an increase in the coagulation factor VWF. Histological analyses showed a clear decrease in collagen density, bone maturation, increased osteoclast density and abundant presence of platelets and loose connective tissue in GEU group.

Conclusions: There was a significant impact of specific dietary supplements in healing of extraction sockets with decreased inflammatory markers with GTO and delayed bone formation observed with GEU. Further studies are needed in this line of research to adequately understand the changes occurring in extraction sockets in patients using dietary supplements.

KEYWORDS: bone healing, extraction socket, bone regeneration, dietary.

Introdução

Cicatrização alveolar

A cicatrização do alvéolo após a extração dental é um evento que busca o interesse de pesquisadores e seus eventos vem sendo descritos frequentemente na literatura científica. A razão principal disso é em função das alterações que ocorrem no processo alveolar que podem evitar ou tornar difícil a instalação do implante dentário em posição ideal para a reabilitação protética (1). Além disso, a alta demanda por estética na odontologia, ressalta a importância da manutenção do rebordo alveolar para se manter uma prótese implantossuportada estética a longo prazo. É esperado que a cicatrização alveolar resulte em um rebordo alveolar com volume de tecido ósseo que permita a instalação ideal de um implante. Cicatrização alveolar é a mudança após a perda dental, que são alterações locais que promovem alterações nos tecidos duros e moles, afim de fechar a ferida e restaurar a homeostase do tecido (2).

A região anterior maxilar apresenta paredes de alvéolo finas, frequentemente formadas somente por osso fasciculado. Esse é dependente do dente e sua estrutura é reabsorvida gradualmente após a exodontia. O processo de cicatrização resulta em uma grande reabsorção

da parede vestibular do alvéolo e menos pronunciada na parede lingual. Essas alterações acontecem logo nos primeiros 3 meses após a extração dental (3–5).

Fatores de crescimento

As respostas de cicatrização iniciais numa ferida são reguladas por fatores de crescimento, que são moléculas de sinalização, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), proteína óssea morfogenética 4 (BMP-4) e proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7) entre outras. Esses iniciam a migração celular, diferenciação e proliferação à medida que interagem umas às outras. Fatores de crescimento atuam como sinais mitogênicos e angiogênicos na fase inicial da cicatrização óssea (2).

A localização espacial e as variações temporais destes fatores de crescimento na cicatrização alveolar após extração dental correlacionaram-se com os eventos histológicos de cicatrização e seguiram as funções biológicas conhecidas destes fatores de crescimento (6).

Alguns estudos vêm relatando o efeito dos fatores de crescimento na cicatrização óssea. Diversas substâncias foram testadas visando melhorar a disposição dos fatores de crescimento, que regulam remodelação, inflamação e quimiotaxia de tecidos (6–12).

Proantocianidinas (PA) X fatores de crescimento

Nos últimos anos, verificou-se um interesse crescente no uso de botânicos naturalmente disponíveis como agentes quimiopreventivos ou quimioterapêuticos para algumas doenças. Uma dessas opções é o extrato de semente de uva que contém lipídios, proteínas, carboidratos e polifenóis. Proantocianidinas são os compostos fenólicos mais abundantes nas sementes de uva. O extrato de PA de semente de uva tem uma atividade antioxidante mais poderosa do que outros antioxidantes bem conhecidos, incluindo vitamina C, vitamina E e ácido gálico. PA tem várias funções biológicas, tais como antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico e ações vasodilatadoras (13–15).

Pouco se sabe sobre os efeitos da PA em regeneração óssea em geral e mais especificamente em processos alveolares, contudo, estudos em ratos já avaliaram os seus efeitos em fatores de crescimento específicos, como um estudo que mostrou que a utilização sistêmica de PA aumentou a expressão de BMP-7 quando testado com RT-PCR (16)

no tratamento de diabetes. PA foi utilizado para tratamento de artrite reumatoide e o grupo teste demonstrou diminuição na expressão de IL-17 (14). Outro estudo também mostrou a diminuição da expressão de interleucina quando submetidos a uma dieta rica em PA para tratamento de asma alérgica (15). Ratos tratados com PA mostraram uma diminuição da expressão de IL-4, IL-5, IL-13, VEGFA e TGF- β 1 nos modelos de asma aguda e crônica (17,18). Contudo, alguns desses fatores também tem ação anti-inflamatória (ex. IL-4), angiogênica (VEGFA) e pró-colágena (TGF- β 1), o que pode não ser positivo diminuir suas expressões em certas condições ou tratamentos.

Naringenina e Hesperidina (NA e HE) X fatores de crescimento

Naringenina e hesperidina são compostos flavonoides encontrados abundantemente na casca de frutas cítricas. Estudos tem relatado que esses compostos foram investigados pelas suas atividades farmacológicas, incluindo efeitos antitumorais, antioxidante, anti-inflamatórios, antivirais e antidiabéticos (19,20).

Um estudo que avaliou o uso de HE em ratos para tratamento de artrite reumatoide, mostrou que ratos tratados com HE tiveram melhores resultados quando comparados ao grupo controle negativo (21). Outro estudo em ratos, que foram testados quanto ao tratamento para fibrose hepática, teve aumento dos valores de TGF- β 1 (22). Em um modelo semelhante, que também tratou fibrose hepática em ratos, HE inibiu a produção e ativação de PDGF (19). Ratos tratados com NA apresentaram níveis mais baixos de IL-4 e IL-13 no tratamento para asma (23). Células pancreáticas tratadas com NA tiveram uma diminuição de TGF- β 1 quando testadas ao seu potencial cancerígeno (24). Ratos tratados com NA demonstraram uma diminuição de TGF- β 1 quando testados em relação à doença renal (20,25,26). NA inibiu danos a ratos induzida pela radiação UVB, com redução de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α e TGF- β 1 (27,28). Os níveis de expressão de IL-6 foram significativamente mais baixos no tecido adiposo perigonadal de ratos suplementados com NA (29). O uso de NA sobre neuropatia diabética induzida experimentalmente em ratos, demonstrou uma diminuição de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (30). Ratos tratados com NA demonstraram uma redução da secreção de TGF- β 1 a partir de células de câncer de mama (31). Em conclusão, há vários fatores inflamatórios e anti-inflamatórios que são diminuídos com HE e NA, porém, há maior ênfase na literatura para a ação anti-inflamatória que esses flavonoides causam. É também possível que a diminuição da

expressão e produção dos fatores de inflamação e fibrose causem uma redução natural na necessidade de produzir fatores anti-inflamatórios.

Proantocianidinas (PA) X cicatrização óssea

Os efeitos esqueléticos da PA, particularmente os exercidos durante o período crítico de crescimento e desenvolvimento, demonstram uma elevada taxa de formação óssea não ainda completamente esclarecidos. Foi investigado o uso de PA sobre a formação óssea examinando massa óssea total e cortical, densidade, arquitetura e força não invasiva usando cêndilos mandibulares de ratos com restrição de cálcio. Os resultados sugerem que o tratamento com PA aumentaria tanto a massa óssea como a resistência óssea nos cêndilos mandibulares dos ratos (32–36). Também foram estudados os efeitos da PA na diáfise de tíbia em ratos com baixo teor de cálcio e o resultado sugere que a PA incluída em uma mistura de dieta com cálcio tem um efeito benéfico na formação óssea e na resistência óssea (37). PA foi utilizado no tratamento de artrite óssea na articulação do joelho do rato e protegeu contra maiores danos nas articulações (38). Outra pesquisa também avaliou em ratos o efeito de PA na artrite reumatoide e seu uso melhorou as manifestações da artrite ao suprimir simultaneamente a diferenciação dos osteoclastos e promover a diferenciação dos osteoblastos (39). Em um estudo de cultura de células foi investigado se PA exerce um efeito anti-apoptose em células osteoblásticas, através de sua atividade antioxidante e os resultados foram positivos quanto a sua utilização (40). Outro estudo demonstrou os efeitos da PA na prevenção de osteonecrose induzida por corticosteróide em coelhos e os resultados revelaram que o tratamento com PA poderia inibir o dano oxidativo e a apoptose por exercer efeitos benéficos na redução da incidência de osteonecrose (41).

Naringenina e Hesperidina (NA e HE) X cicatrização óssea

Em estudo de cultura de osteoblastos foi examinado a capacidade da HE para afetar a proliferação, diferenciação e mineralização de osteoblastos primários derivados de camundongos e os resultados sugerem que HE pode aumentar a produção de osteoblastos (42,43). O efeito de HE e NA, duas flavonoides cítricas principais, na regulação do metabolismo ósseo foi examinado em ratos e os resultados demonstraram que essas substâncias protegem contra a perda óssea em ratos, agindo principalmente através da inibição da reabsorção óssea.

HE demonstrou-se mais eficaz do que NA apesar da sua menor biodisponibilidade (44). Outros trabalhos tiveram como objetivo examinar se HE inibe a perda óssea em ratos e os resultados indicaram que HE inibiu a reabsorção e hiperlipidemia óssea (45–48).

Hipótese Positiva

Baseado nos estudos acima citados, foi criada a hipótese que pacientes sujeitos a uma suplementação diária de fitoterápicos com PA e NA/HE por tempo e dose significativas mostrariam um efeito na cicatrização óssea de alvéolos de extração dental.

Materiais e Métodos

Seleção da amostra

Após aprovação do projeto pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer CONEP 740.532) e do Institutional Review Board, localizado na Universidade da Pensilvânia, EUA, foram selecionados pacientes adultos do sexo masculino, que necessitavam da extração de elemento dental e instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética. Foram excluídos os pacientes que apresentavam histórico de quimioterapia ou radioterapia de cabeça e/ou no pescoço, doença periodontal prévia, etílicos, história de terapia com bisfosfanatos, diabéticos descompensados, fumantes e/ou que apresentem qualquer contraindicação para cirurgia oral.

Os pacientes foram triados na clínica odontológica do Centro de Estudos em Implantes Dentários (CEPID) do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os pacientes submetidos à pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando sua participação e coleta dos dados clínicos e histológicos.

Foram formados três grupos de acordo com o tipo de fitoquímico utilizado:

- GRUPO 1 (GEU): Extrato de semente de uva [Proantocianidinas]
- GRUPO 2 (GTO): Extrato de semente de toranja [Naringenina/Hesperidina]

- GRUPO 3 (CON): Grupo controle [nenhum fitoquímico]

Cada modalidade de tratamento [PA, NA/HE e grupo controle] foi realizado em 10 pacientes, aleatoriamente distribuídos nos grupos. Pacientes do grupo GEU ingeriram 300 mg do fitoquímico 3 vezes ao dia (Grape Seed Extract, GNC, Pittsburg, PA, EUA) e os pacientes do grupo GTO ingeriram 250 mg 3 vezes ao dia (Grapefruit Seed Extract, Nature's Way, Springville, UT, EUA). Os pacientes do grupo controle não receberam nenhum fitoquímico. Os pacientes iniciaram a ingestão de fitoquímicos duas semanas antes da cirurgia de extração dental e mantiveram esse regime por mais oito semanas após a extração, totalizando 10 semanas de uso, até o momento da instalação do implante.

O uso contínuo dos fitoterápicos foi confirmado através de entrevista antes dos procedimentos cirúrgicos. Efeitos colaterais foram reportados no prontuário de cada paciente e informações sobre hábitos alimentares esclarecidos durante a primeira visita (ex.: pacientes não deveriam evitar tomar vinho, consumir chocolate entre outras restrições durante o estudo).

Procedimentos cirúrgicos

Cirurgia I – Extração dental e coleta material do alvéolo:

Antes da extração do elemento dental, cada paciente foi submetido aos procedimentos de assepsia intra-bucal com bochecho de solução de gluconato de clorexidina 0,12% (Periogard, Colgate, São Paulo, SP, Brasil), 15 ml, por 1 minuto e assepsia extra-bucal com digluconato de clorexidina 2% (Riohex 2%, Rioquímica Industria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Anestesia local foi executada com cloridrato de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100,000 (Mepiadre 100, Nova DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), por meio de técnicas anestésicas infiltrativas e bloqueios regionais.

A exodontia foi realizada de maneira conservadora de modo a preservar as paredes remanescentes do alvéolo. Após curetagem intensa e irrigação copiosa do alvéolo, foi obtida a hemostasia e o local preenchido com uma esponja de colágeno (Collagen Plug, Zimmer, Carlsbad, CA, EUA) e suturado com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para isolar o ferimento da cavidade oral. Os participantes foram instruídos quanto aos cuidados pós operatórios, incluindo medicação com paracetamol 750 mg

(Tylenol 750, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) a cada 8 horas durante 5 dias.

Após 24 horas da extração dos dentes, todos os pacientes retornaram à coleta do material biológico para análise genética. Sob anestesia local, foi removida a sutura e a membrana Collagen Plug, juntamente com uma pequena quantidade do coágulo no interior do alvéolo. O local foi novamente suturado com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) após a remoção da amostra. O espécime de biópsia foi imediatamente colocado em solução para estabilização do RNA (RNAlater, Ambion, Austin, TX, EUA), para o transporte evitando a degradação do material.

Cirurgia II – Biópsia óssea e instalação do implante dental:

Sessenta dias após a extração dental, os pacientes foram novamente chamados para novo procedimento cirúrgico. Cada paciente foi submetido ao mesmo protocolo cirúrgico de assepsia intra-bucal e extra-bucal. Anestesia local foi executada por meio de técnicas anestésicas infiltrativas e bloqueios regionais. Um retalho de espessura total foi levantado e um espécime ósseo cilíndrico de 3mm por 6mm foi obtido pelo uso de uma broca trefina. As amostras ósseas foram colhidas e fixadas em paraformaldeído durante 3 dias a 4°C e então transferido para solução salina e armazenado a 4°C.

Imediatamente após a biópsia, os implantes (Implante UN II Cone Morse, Implacil De Bortoli, São Paulo, SP, Brasil) foram instalados conforme o protocolo estabelecido pela empresa e as condições ósseas avaliadas em tomografia computadorizada do Cone Beam realizada 10 antes da cirurgia. A área cirúrgica foi suturada com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para estabilizar o retalho.

Os participantes foram instruídos quanto aos cuidados pós operatórios, incluindo medicação com: amoxicilina 500 mg (Amoxil 500, GSK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a cada 8 horas durante 7 dias; clindamicina 600 mg (Dalancin C 300 mg, Pzifer, Guarulhos, SP, Brasil) a cada 8 horas por 7 dias, se alérgico à penicilina; nimesulida 100 mg (Scaflam 100, Mantecorp, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a cada 12 horas por 5 dias e paracetamol 750 mg (Tylenol 750, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) a cada 8 horas durante 5 dias.

As suturas foram removidas 7 dias após a cirurgia e os pacientes foram acompanhados. Nenhum implante teve falha na osseointegração e todos os pacientes receberam a reabilitação protética.

Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR)

Isolamento RNA:

Amostras de tecidos foram colhidas e armazenadas em frascos Eppendorf *RNALater* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e congelado a -20°C . Durante o isolamento, todas as superfícies e instrumentos foram tratados com *RNase Away* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para evitar a degradação do RNA e contaminação de DNA. Uma amostra por paciente foi escolhida e descongelada e finamente picada com tesouras cirúrgicas limpas e transferida para um frasco Eppendorf sem RNase contendo 1 ml de reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. O material lisado foi transferido para um homogeneizador *QIAshredder* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e centrifugado a 12.000 g durante dois minutos. Material lisado homogeneizado foi transferido a um frasco Eppendorf novo sem RNase contendo 200 μL de clorofórmio (Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA), agitado vigorosamente durante 15 segundos, e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 minutos. As amostras foram em seguida centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C , resultando numa separação de 3 fases. A fase supra aquosa contendo RNA (cerca de 600 μL) foi cuidadosamente pipetada e transferida para um novo frasco Eppendorf. Um volume igual de etanol 70% em água deionizada livre de RNase foi adicionado a cada amostra e bem misturado por vórtex. RNA isolado foi purificado usando o kit de purificação de RNA *TRIzol Plus* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. 1 μL de RNA purificado foi analisado com a *NanoDrop One^C* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para determinar rendimento e pureza do RNA.

Síntese de cDNA e qRT-PCR:

Bibliotecas de cDNA foram geradas utilizando o kit *Omniscript Reverse Transcriptase* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e *primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. 200 ng de RNA purificado foi utilizado em cada reação de transcriptase reversa. qRT-PCR foi realizada em reações de 20 μL em triplicatas usando 1 μL de cDNA e kit *TaqMan Gene Expression Master Mix* com uracila-N glicosilase (UNG) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). *Primers TaqMan* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para os seguintes genes alvos foram

analisados: proteína óssea morfogenética 4 (BMP-4), proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7), fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), quimiocina ligante 2 (CXCL2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transcrição relacionados nanico 2 (RUNX2), fator de coagulação de protrombina II (F2) e fator de von Willebrand (VWF). Conforme recomendado pelo fabricante, o perfil térmico seguinte foi usado para reações de qRT-PCR em um sistema de detecção de sequência *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): ativação UNG em 50°C durante 2 minutos, ativação polimerase em 95°C durante 10 minutos, PCR (40 ciclos) em 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Histologia óssea

Coleta do tecido e preparação:

O tecido ósseo, após o período de cicatrização de 60 dias foi colhido com trefina e fixado em paraformaldeído durante 3 dias a 4°C e então transferido para solução salina e armazenado a 4°C. Os tecidos de maxila e mandíbula (um por paciente) foram desmineralizados em ácido etilenodiaminotetracético 0.5 M (EDTA) (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), pH 7.6, durante 9 semanas sob agitação suave contínua em um balanço a 4°C. EDTA foi trocado 3 vezes por semana. As amostras foram transferidas para solução salina nova e subsequentemente embebidos em parafina para secção histológica.

Cortes seriados de espessura de 6 μ m foram montados para coloração histológica com hematoxilina e eosina (H&E), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), e picrosirius red (PSR). Previamente a todos os procedimentos de coloração, as secções foram desparafinadas em 3 trocas de xilenos (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 3 minutos, e reidratado numa série de etanóis (Decon Labs, King of Prussia, PA, EUA) diluições conforme a seguir, duas trocas a cada dois minutos: 100%, 95%, 80%, 70% e 50%. Após a conclusão de cada procedimento de coloração, amostras foram desidratadas numa série de diluições de etanóis conforme a seguir, uma troca a cada um minuto: 70%, 90% e 100%.

Finalmente, as amostras foram clarificadas, em 3 trocas de xileno durante 3 minutos cada. As amostras foram deixadas secar e montadas em lamínula usando duas gotas do meio de montagem Acrytol (Lieca Biosystems, Richmond, IL, EUA).

Hematoxilina e eosina (H&E):

Após desparafinização e reidratação, amostras de H&E foram coradas com Gill #3 hematoxilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 5 minutos e transferidas para água de torneira corrente por um período adicional de 5 minutos. As amostras foram diferenciadas em ácido alcoólico 1% (1% 12N HCl (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em etanol 70% durante 5 minutos e seguido por água de torneira corrente durante 5 minutos. As amostras foram contrastadas durante 10 minutos em 0.5% w/v Eosin Y aquoso (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguido de uma lavagem de 5 minutos em água de torneira corrente. As amostras foram em seguida desidratadas e montadas para imagiologia.

Picrosirius Red (PSR):

Após desparafinização e reidratação, amostras de PSR foram coradas em solução de Sirius Red 0.1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) durante 30 minutos. As amostras foram então lavadas em 3 mudanças de água de torneira acidificada [0.5% ácido acético glacial (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA)] durante 5 minutos cada. As amostras foram então lavadas durante 90 minutos, em água da torneira antes de desidratar e montar para imaginologia.

Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP):

Soluções tampão I, II, III e IV foram preparadas como segue para a coloração TRAP. Tampão I: acetato de sódio 0.1 M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido tartárico 0.05 M L-(+) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água deionizada acidificada (2.8 mL ácido acético glacial por 950 mL de água). O pH final foi ajustado a 4,9 com hidróxido de sódio 5 M (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Tampão II: fosfatase Naphthol AS-BI 0.05 M em éter de etileno glicol monoetílico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Tampão III: nitrito de sódio 0.75 M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água deionizada. Tampão IV: cloridrato de pararosanilina 0.15 M em ácido clorídrico 2 N (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) aqueceu-se a 60°C durante 5 minutos e filtrado através de papel Kimwipes (Kimberly-Clark, Irving, TX, EUA).

Dois jarras de Coplin foram preenchidas com 50 ml de Tampão I e aqueceu-se à 37°C numa incubadora. Após desparafinização e reidratação, as amostras foram colocadas em água de torneira corrente por dois minutos seguido por água deionizada durante um minuto. 0.5m

L de Tampão II foi adicionada a primeira jarra de Coplin contendo Tampão I e as amostras foram transferidas para a solução e incubou-se a 37°C durante uma hora. Após uma hora, 1 mL do Tampão III e 1 mL do Tampão IV foram misturados num tubo cônico e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante dois minutos antes de ser adicionado à segunda jarra de Coplin contendo 50 ml de Tampão I fresca e aquecida à 37°C. As amostras foram transferidas para a segunda jarra de Coplin e incubou-se à 37°C durante 12 minutos, seguido por 3 mudanças de água deionizada durante 2 minutos. 10-20µL de Gill #3 hematoxilina diluído 1:4 com água deionizada foi pipetada para cada secção de tecido por 3-5 segundos antes de ser transferido para a água corrente da torneira.

Por fim, as amostras foram enxaguadas com 2 trocas de água deionizada durante 2 minutos cada antes de ser desidratada, clareada em xilenos e montado para imaginologia.

Imaginologia:

As imagens das lâminas de H&E e PSR foram obtidas de um microscópio óptico Olympus BX61 (Center Valley, PA, EUA) a 4, 10 e 20 vezes de magnificação. As imagens das amostras de H&E foram obtidas em modo de campo claro e capturadas com a câmera digital Hamamatsu ORCA RC CMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japão) e velocidade controlada pelo software Velocity (Improvision, Coventry, Reino Unido). As imagens das amostras de PSR foram obtidas a partir de configurações idênticas para cada ampliação no modo de campo claro com um condensador de luz polarizada.

As imagens das amostras de TRAP foram obtidas de um microscópio óptico Olympus BX40 (Center Valley, PA, EUA) a 4, 10 e 20 vezes de magnificação em modo de campo claro e capturados com a câmera digital QColor3 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) com velocidade controlada pelo software QCapture Pro 7 (Q Imaging, Surrey, BC, Canada).

Análise estatística

qRT-PCR:

Os dados qRT-PCR foram processados usando o método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Expressão relativa média dos genes, *fold change* e desvio padrão foram determinados. Análise estatística foi realizada inicialmente usando *one-way ANOVA* para testar qualquer diferença significativa entre os grupos. Se os resultados foram

significativos ($p \leq 0,05$), utilizou-se o teste t para determinar as diferenças específicas entre as médias (com correção de Bonferroni para considerar comparações múltiplas) para comparar as diferenças específicas entre os grupos com o software JMP Pro 11 (SAS, Cary, NC, EUA).

Histologia óssea:

Análise histomorfométrica foi realizada nas amostras de H&E e PSR para determinação da área óssea total e distribuição da intensidade do sinal de cor, respectivamente. As amostras de H&E e PSR foram capturadas em ampliação de 4 vezes e montadas em uma imagem composta de toda a amostra, criada pelo software Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

Nas imagens de H&E, um filtro binário da área de tecido total foi criado selecionando a área de tecido com a ferramenta de seleção rápida e convertendo em preto o tecido ósseo, com a área restante da seleção convertida em branco. As áreas dos filtros de tecidos foram calculadas no software ImageJ (NIH, Bethesda, MA, EUA) e a porcentagem de osso em cada amostra de tecido foi calculada.

As imagens de PSR foram analisadas utilizando um algoritmo gerado personalizado em Matlab R2016a (Mathworks, Natick, MA, EUA). As imagens de PSR foram convertidas para o sistema de cores HSV (H – Matiz, S – Saturação, V – Valor), usando o aplicativo de limiar de cores. Área total de cores de pixels foi determinada pelo limiar da imagem com configurações H, S e V de 0-1, 0-1 e 0.117-0.964, respectivamente e criado um filtro binário. Áreas de cores definidas como vermelho, amarelo e verde foram determinadas pelo limiar do canal H – Matiz como se segue: Vermelho (0,871-0,128), Amarelo (0,128-0,203) e Verde (0,202-0,463). O código gerado automaticamente usando o aplicativo de limiar de cor foi usado para processar todas as imagens com os mesmos filtros HSV. O percentual de área de Vermelho, Amarelo e Verde foi regulado pelo sinal de cor total e calculado para cada amostra. O colágeno corado em vermelho significa uma matriz com fibras mais densas ou compactas e os corados em verde, tem as fibras mais frouxas (49,50).

Nas imagens de TRAP, os osteoclastos foram contados em áreas com coloração TRAP positiva que também continham pelo menos dois núcleos. O número de células de revestimento ósseo foi determinado para estimar a atividade de osteoblastos de cada amostra contando núcleos sem coloração TRAP que estavam nas superfícies ósseas. Osteoblastos e osteoclastos foram contados nas amostras com

uma ampliação de 20 vezes para uma precisão melhorada e toda a amostra foi contada por exploração sistemática de toda a lâmina. A área óssea total foi mensurada da mesma maneira que as amostras de H&E para calcular a quantidade de osteoblastos e osteoclastos por milímetro quadrado.

Análise estatística da área óssea (H&E), distribuição de cor (PSR) e contagem de osteoblastos e osteoclastos (TRAP) foi realizada inicialmente usando *one-way ANOVA* para testar qualquer diferença significativa entre os grupos. Se os resultados foram significativos ($p \leq 0,05$), utilizou-se o teste *t* para determinar as diferenças específicas entre as médias (com correção de Bonferroni para considerar comparações múltiplas) para comparar as diferenças específicas entre os grupos com o software JMP Pro 11 (SAS, Cary, NC, EUA).

Resultados

Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR)

Os seguintes genes alvo foram analisados: fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína óssea morfogenética 4 (BMP-4), proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7), fator de transcrição relacionados nanico 2 (RUNX2), interleucina 1- β (IL-1 β), quimiocina ligante 2 (CXCL2), interleucina 6 (IL-6), fator de von Willebrand (VWF) e fator de coagulação de protrombina II (F2). Esses fatores foram escolhidos devido a importância em cicatrização nas primeiras 24 horas.

Na análise de fatores de crescimento não houve diferença significativa na expressão de VEGFA entre os tratamentos comparado ao controle ($1,02 \pm 0,18$ e $0,89 \pm 0,11$ *fold change* comparado ao controle para GEU e GTO, respectivamente). Contudo, a expressão de TGF- β foi significativamente reduzida em GTO ($0,61 \pm 0,07$) comparado ao controle (Fig. 1). Além disso, a expressão de PDGF foi significativamente reduzida nos grupos GTO ($0,26 \pm 0,07$) comparados a GEU ($0,78 \pm 0,17$), embora não haja diferença significativa quando ambos são comparados ao controle (Fig. 2). Os fatores de crescimento BMP4, BMP7 e RUNX2 não foram detectados.

A análise de marcadores de inflamação indicou que tratamento com GTO levou a uma diminuição significativa da expressão de CXCL2 (Fig. 3) e IL-6 (Fig. 4) comparado ao controle ($0,46 \pm 0,07$ e $0,35 \pm 0,1$ para CXCL2 e IL-6, respectivamente). Além disso, houve uma

diminuição significativa na expressão de IL-1 β (Fig. 5) no grupo GTO ($0,79 \pm 0,17$) comparado ao GEU ($1,62 \pm 0,27$).

Por último, a análise de fatores de coagulação demonstrou que tratamento com GEU levou a um aumento significativo na expressão de VWF comparado a GTO ($2,04 \pm 0,44$ e $0,81 \pm 0,26$ para GEU e GTO, respectivamente) (Fig. 6). Trombina (F2) não foi detectada em nenhuma amostra.

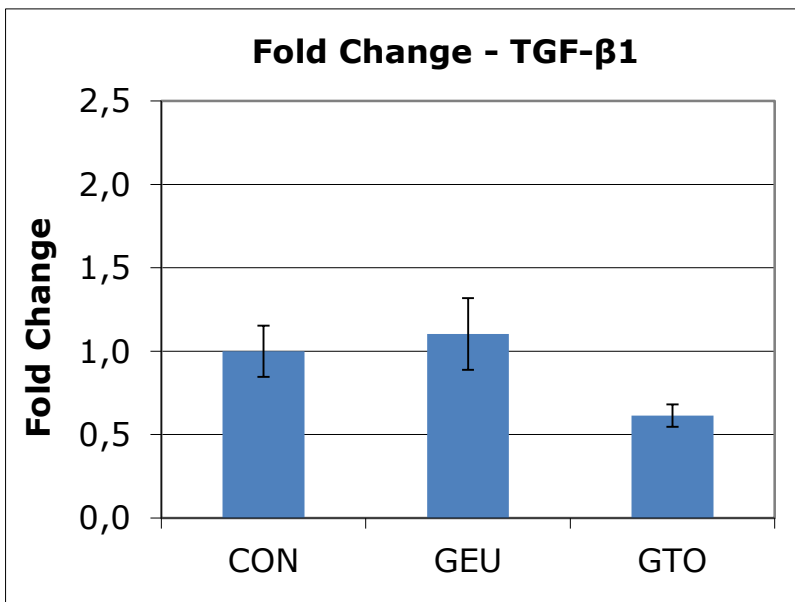


Figura 1: Fold change do fator TGF- β 1. Teste *t* mostrou diferença de GTO em relação a CON e GEU

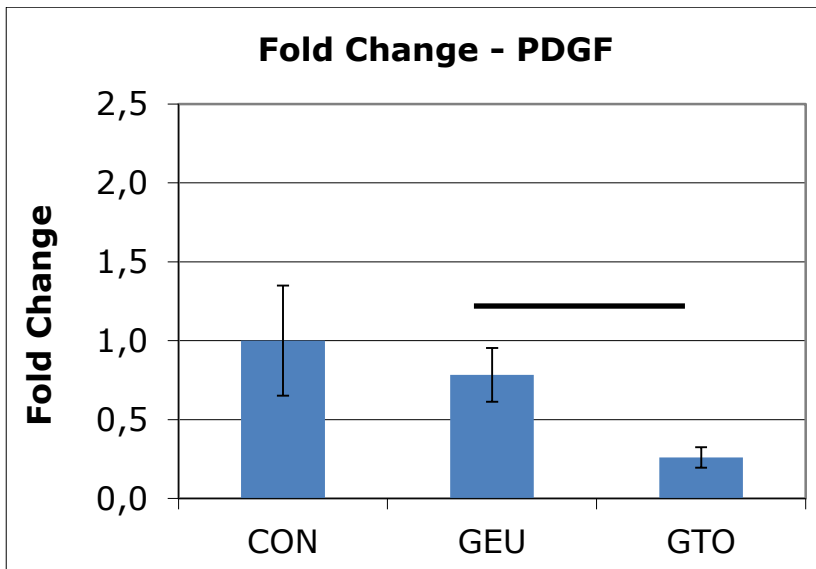


Figura 2: Fold change do fator PDGF. GEU e GTO significante com correção Bonferroni. CON e GTO diferente com teste *t*.

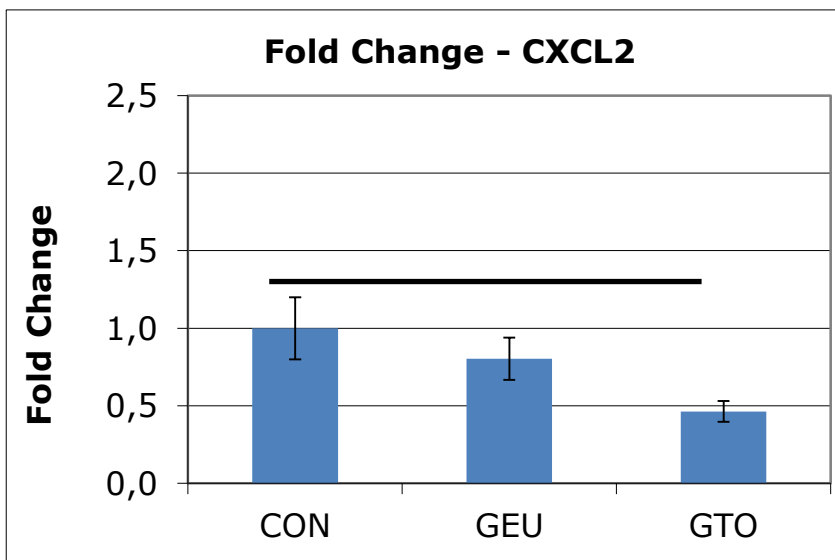


Figura 3: Fold change do fator CXCL2. CON e GTO significantes com correção Bonferroni.

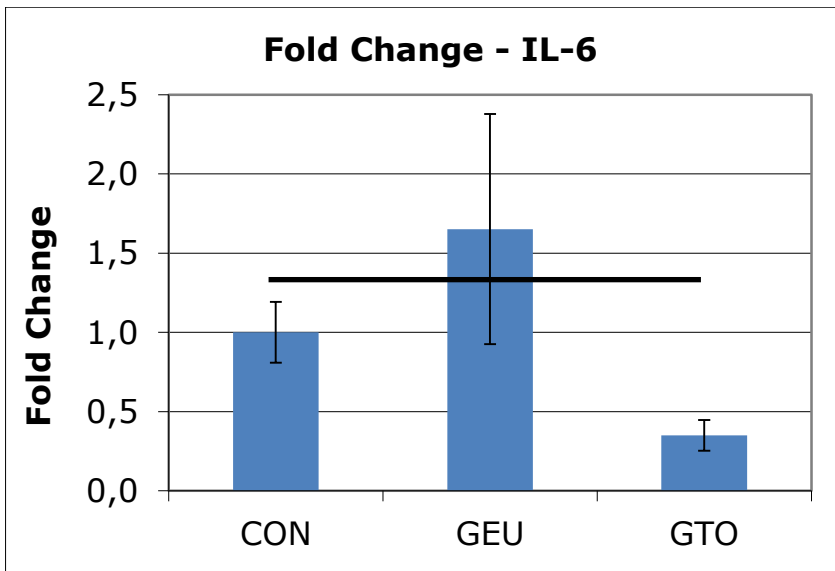


Figura 4: Fold change do fator IL-6. CON e GTO significantes com correção Bonferroni. GEU e GTO diferente com teste *t*.

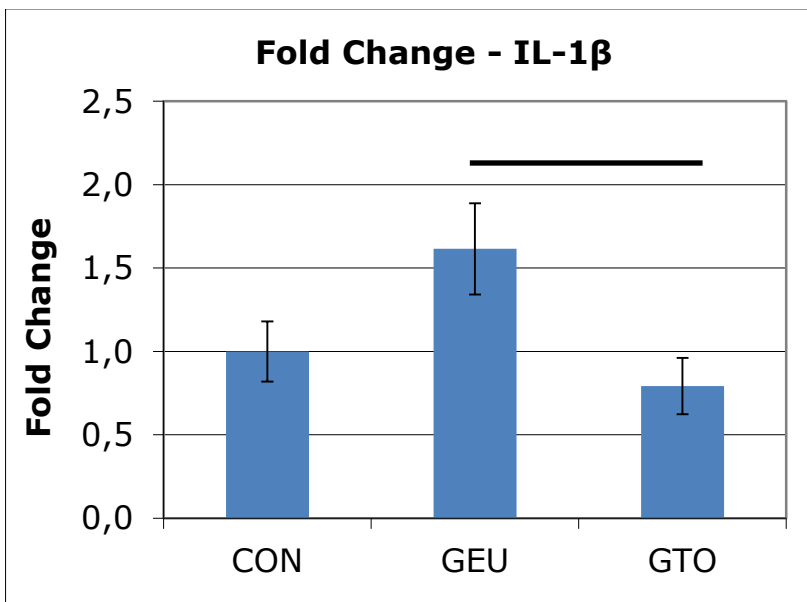


Figura 5: Fold change do fator IL-1 β . GEU e GTO significantes com correção Bonferroni.

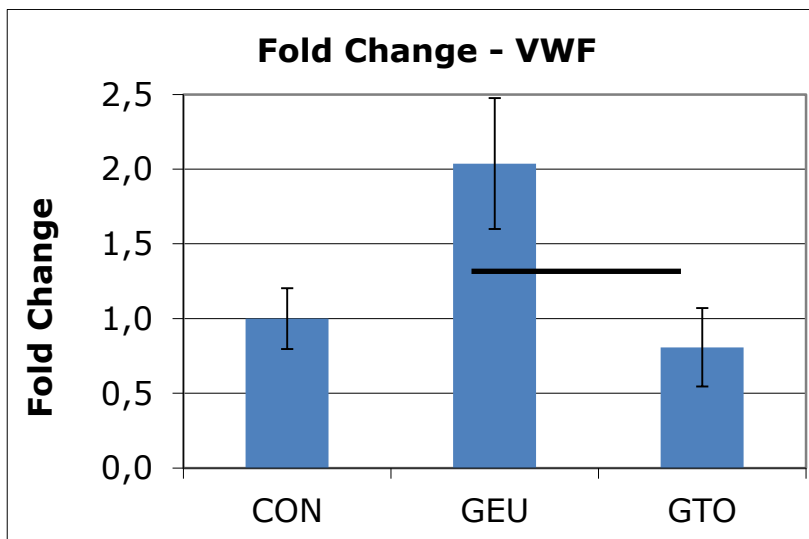


Figura 6: Fold change do fator VWF. GEU e GTO significante com correção Bonferroni. CON e GEU diferente com teste *t*.

Histologia óssea

Lâminas histológicas foram montadas para coloração histológica com hematoxilina e eosina (H&E), picrossirius red (PSR) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

A avaliação das lâminas de H&E determinou o percentual da área óssea presente em relação ao total de tecido presente na imagem. O grupo CON (49,9%) teve diferença estatisticamente significativa em relação a GEU (28,8%). O grupo GTO teve 39,9% de tecido ósseo na lâmina e não foi estatisticamente diferente do controle (Fig. 7). Uma análise qualitativa da amostra de GEU também revelou um alto número de plaquetas e tecido conjuntivo frouxo comparado ao controle (Fig. 8).

Na avaliação das lâminas com PSR, que determinou a distribuição do sinal das cores vermelho, amarelo e verde, obtiveram-se os seguintes percentuais em cada grupo respectivamente: CON ($70,1 \pm 4,2/27,1 \pm 3,5/4,4 \pm 1,2$), GEU ($66,2 \pm 3,8/29,8 \pm 1,4/6,3 \pm 2,3$) e GTO ($73,4 \pm 5,7/25,1 \pm 4,9/2,9 \pm 1,5$) (Fig. 9). Não houve diferença estatisticamente significativa, porém há uma tendência, embora não significativa, do GTO ter mais colágeno maduro/organizado comparado com GEU quando uma análise qualitativa é feita. Há maior evidência de um tecido ósseo imaturo (“woven”/reticular) em GEU comparado com GTO que apresenta mais tecido ósseo maduro (lamelar) (Fig. 10).

A avaliação das lâminas de TRAP calculou a média da quantidade de osteoclastos por milímetro quadrado em cada lâmina. O grupo GEU ($1,02 \pm 0,13$) apresentou diferença estatisticamente significativa no número de osteoclastos em relação ao GTO ($0,29 \pm 0,12$) ($p < 0,005$), embora não tenha sido diferente do controle ($0,78 \pm 0,57$) (Fig. 11).

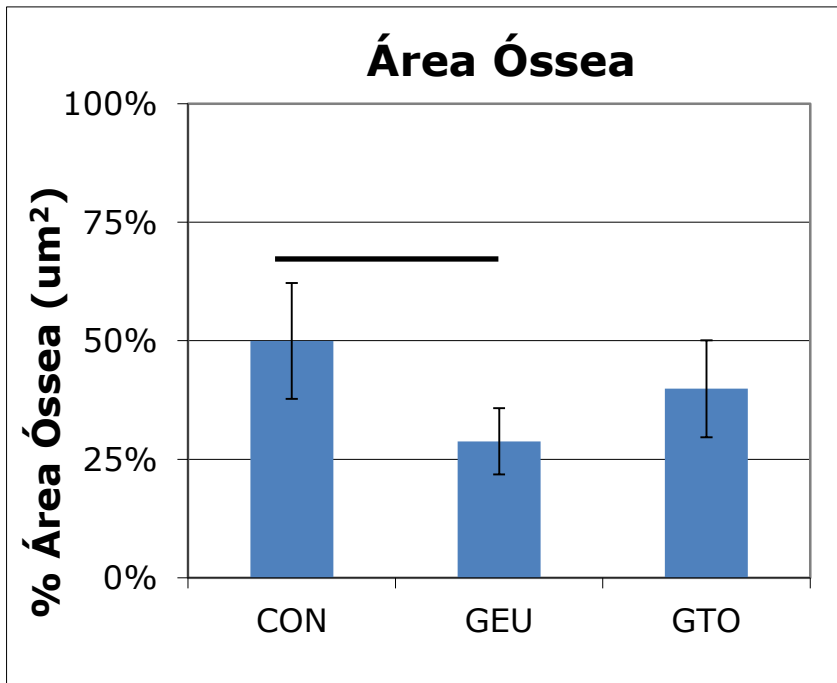


Figura 7: Avaliação da área óssea nas lâminas de H&E. CON e GEU diferente estatisticamente com teste *t*.

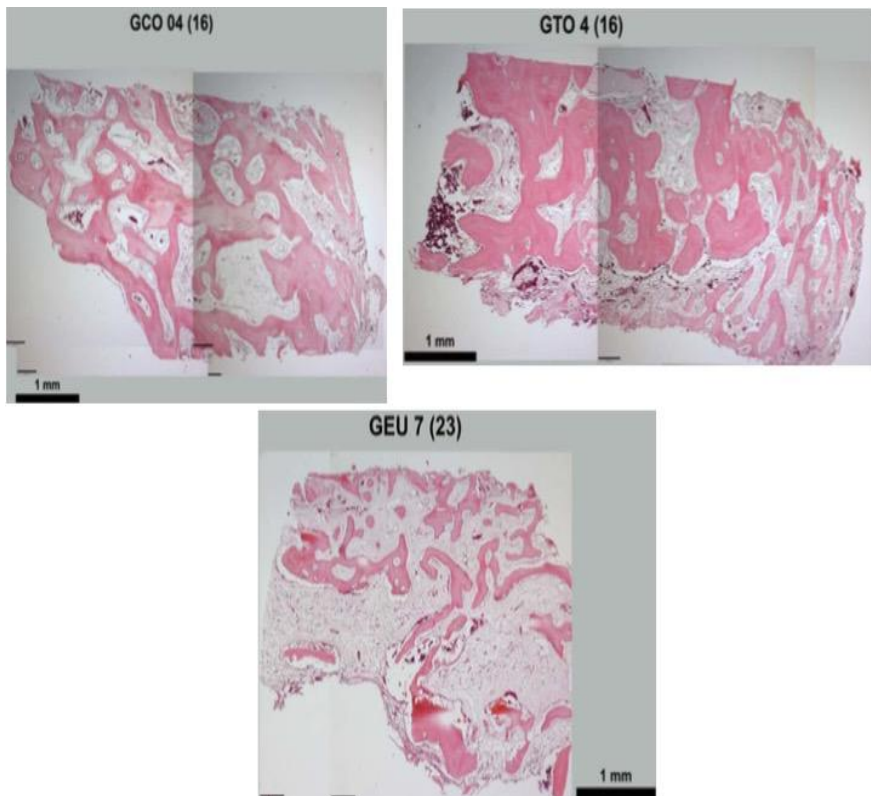


Figura 8: Análise qualitativa das amostra coradas em H&E com aumento 4x.

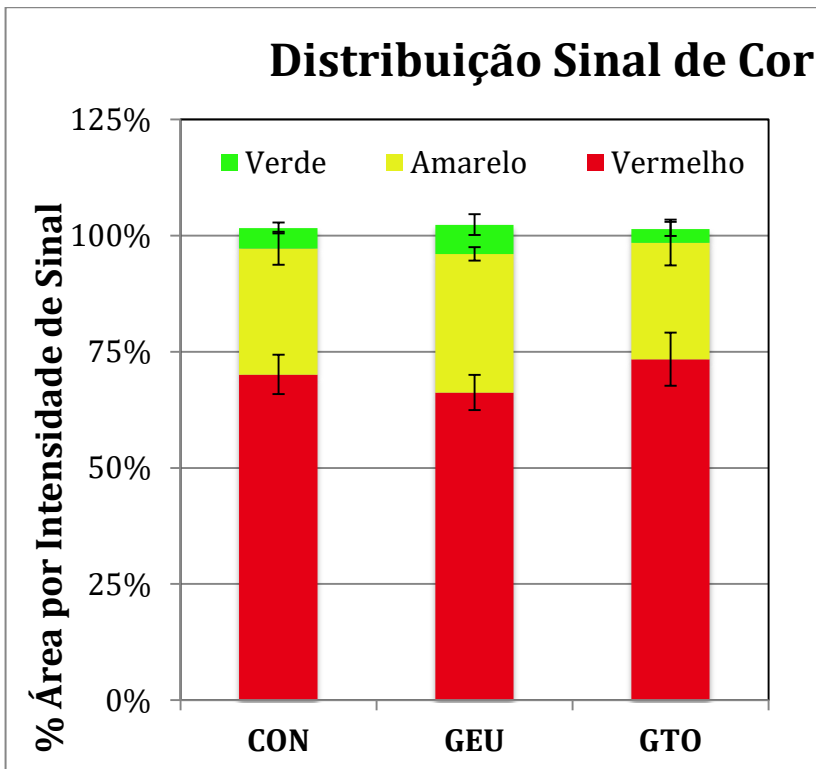


Figura 9: Distribuição do sinal das cores nas lâminas de PSR. Sem diferença estatística.

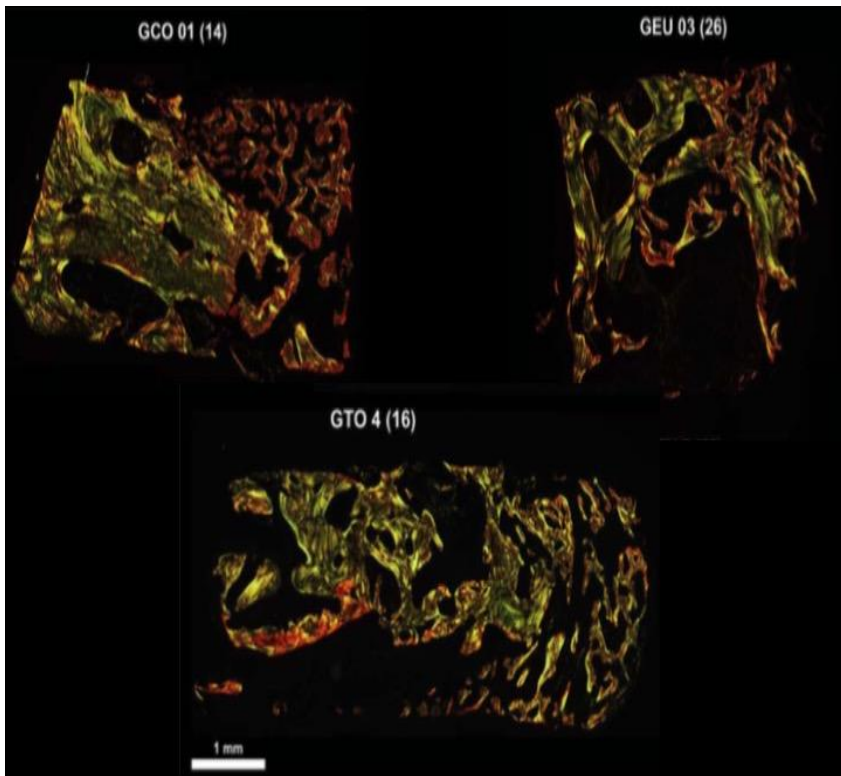


Figura 10: Análise qualitativa das amostra coradas com PSR com aumento 4x.

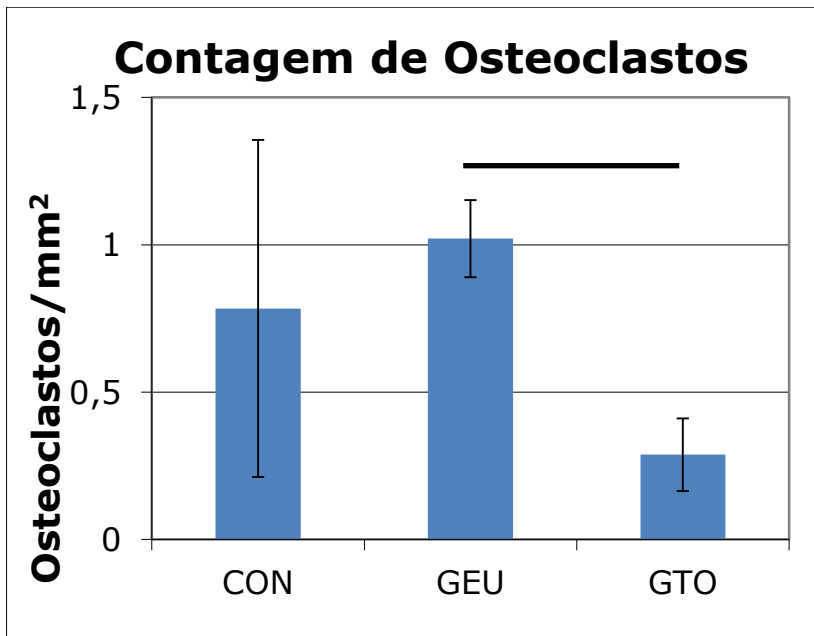


Figura 11: Contagem de osteoclastos nas lâminas de TRAP. GEU e GTO diferente estatisticamente com teste *t*.

Discussão

O presente estudo analisou a atividade de fatores de crescimento e histomorfometria óssea em alvéolo de extração de indivíduos tratados com suplementação dietética buscando avaliar as mudanças em alvéolos de extração em humanos. Tema esse que vem despertando o interesse de cirurgiões-dentistas em relação às condições ósseas para instalação de implantes dentários e estética gengival. Não foi encontrado na literatura científica internacional modelo de experimento semelhante a este que avaliou a utilização desses suplementos em seres humanos. Grande parte dos estudos até então foi realizado em ratos e *in vitro*.

A suplementação com extrato de semente de toranja, que contém naringenina e hesperidina, demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa nos fatores de crescimento TGF- β 1 em relação ao grupo controle, e PDGF em relação somente ao grupo GEU. Diminuição também encontrada no marcador inflamatórios IL-1 β , em relação ao grupo GEU; CXCL2 e IL-6 tiveram ambos diminuição em

relação ao grupo controle. A diminuição do nível de TGF- β 1 já foi relatada em estudos em ratos para tratamento de doença renal, pancreática e cancerígena (20,24–26,31). Assim como também foi relatada a diminuição de PDGF em ratos tratados para fibrose hepática (19). Os resultados dos marcadores inflamatórios corroboram com outros estudos em ratos (23,27–30). Esses resultados estão em acordo com a literatura sobre o uso de toranja que suporta algum efeito anti-inflamatório e de proliferação e formação de tecido conjuntivo, visto que essas são interleucinas de grande atividade no processo inflamatório. TGF- β 1 e PDGF são de importância vital na formação óssea (17–19,22,24).

O grupo testado com extrato de semente de uva, que contém proantocianidinas, teve um aumento no valor do fator de coagulação VWF em relação ao grupo GTO. Outro estudo *in vitro* avaliou os efeitos da proantocianidina na inibição seletiva da expressão da molécula de adesão celular demonstrando uma diminuição dos valores de VWF (51). Porém, esse estudo foi feito *in vitro* e observou o efeito em células sob condições diabéticas e que expressam grande quantidade de inflamação. Outro estudo foi feito *in vivo* e observou o efeito de extrato de uva em um modelo animal (rato) de trombose vascular. Foi concluído que o extrato reduz trombose por diminuir fatores como molécula de adesão celular e VWF (52). O aumento deste fator em nosso estudo pode sugerir uma tentativa de alcançar uma melhor coagulação sanguínea, visto que, há maior inflamação na área no grupo tratado com essa suplementação. Não está claro por que há mais plaquetas nas amostras de GEU.

Embora não significativa, há uma tendência de IL-1 β e IL-6 ser maior em GEU em relação ao grupo controle. Com maior número de amostras é possível que essa diferença se mostre significativa. O aumento nesses fatores inflamatórios no presente estudo, não vai de acordo com estudos feitos em animais (38,53). Porém, a maioria dos estudos lida com uma quantidade maior de extrato/kg por dia, o que influenciaria a resposta celular.

Os fatores BMP-4, BMP-7, RUNX2 e F2 de coagulação tiveram valores insuficientes e não foram detectados nas amostras. Sugerimos que em razão do pouco tempo, cerca de 24 horas entre a extração do dente e a coleta do coágulo, não foi suficiente para que houvesse a expressão desses fatores.

Essas mudanças nos valores de fatores de crescimento se dão somente em nível genético e não necessariamente em nível de proteínas no coágulo.

A análise histomorfométrica das lâminas de H&E mostrou uma diminuição estatisticamente significativa do percentual de tecido ósseo no total de tecido presente nas amostras do grupo GEU comparado ao grupo CON. Outros estudos em ratos que avaliaram o efeito de suplementação de proantocianidina, demonstraram aumento de massa óssea, resistência e formação óssea (32–37). Entretanto, todos esses estudos *in vivo* realizaram testes diferentes dos utilizados por esse experimento, utilizando diferentes modelos de animais, dose suplementada e modelos de doenças, o que dificulta a comparação. Contudo, nossos resultados vão contra nossa hipótese inicial de que haveria um efeito positivo no emprego de GEU na cicatrização do alvéolo. GTO não mostrou diferença na quantidade de formação óssea, também rejeitando a hipótese.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas lâminas de PSR, a qual calculou a distribuição de sinais de cores presente nas amostras. Contudo, há menos deposição de colágeno, pois observa-se menos fibras compactadas no grupo GEU quando comparado aos demais grupos.

A contagem de osteoclastos nas lâminas de TRAP demonstrou um aumento estatisticamente significativo na sua quantidade por milímetro quadrado no grupo GEU quando comparado ao grupo GTO. O grupo CON demonstrou uma alta variação, de acordo com o desvio padrão do grupo. Um estudo em ratos avaliou o efeito de proantocianidina na artrite reumatoide e seu uso melhorou as manifestações da artrite ao suprimir simultaneamente a diferenciação dos osteoclastos e promover a diferenciação dos osteoblastos (39). Este resultado sugere uma maior remodelação óssea dos indivíduos suplementados com proantocianidina. A presença de inflamação local pode afetar a quantidade de osteoclastos como reportado (54).

De uma maneira geral, na análise histológica o grupo GEU demonstrou uma diminuição da formação óssea local, pois observamos osso muito imaturo e menos denso. Além disso, há muito mais plaquetas e tecido fibroso nos sítios.

A constante remodelação do tecido ósseo proporciona um mecanismo de cicatrização sem sequelas e regeneração de tecido ósseo danificado, que resulta na requintada microarquitetura lamelar do osso cortical e trabecular maduro (55). Essa remodelação inicial se dá no formato de osso reticular, que amadurece para osso trabecular ou cortical maduro. Dentro do alvéolo de extração, lâminas que avaliam essa cicatrização inicial abrigavam osteoclastos, que também foram observadas dentro dos canais de Volkmann e indicaram que o processo

de remodelação desse tecido ósseo particular estava em andamento. Ao passo que no decorrer do processo de remodelação o tecido ósseo reticular é substituído por tecido ósseo lamelar (3,4,56). A imaturidade estrutural observada com o grupo GEU pode ser indicativa de rápida remodelação e portanto o osso reticular não atinge a maturidade, já que, maior quantidade de osteoclastos está presente comparado a outros grupos e estes constantemente remodelando o osso recém formado.

A qualidade óssea não foi testada nesse estudo, porém é possível que a maturação óssea seja alcançada no grupo GEU com mais tempo de cicatrização. Isto deverá ser avaliado em futuros estudos por uso de tomografia computadorizada ou biopsia do tecido ósseo após mais tempo de cicatrização.

A dificuldade de compreensão dos resultados encontrados nesta pesquisa demonstra que esses dados devem ser observados com cautela, pois a biologia óssea de um alvéolo de extração é bastante complexa. Assim, o presente estudo desperta o interesse no entendimento das mudanças que os suplementos alimentares podem promover na cicatrização alveolar imediata, necessitando da continuidade de experimentos que possam validar os reais benefícios do uso destes compostos.

Conclusão

Houve um impacto significativo de suplementos dietéticos específicos na cicatrização de alvéolos de extração com diminuição dos marcadores inflamatórios em GTO e formação óssea atrasada observada em GEU.

São necessários outros estudos nesta linha de pesquisa, para que se possa compreender adequadamente as modificações que ocorrem nos alvéolos de extração em pacientes que fazem o uso de suplementos alimentares.

Referências

1. Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2004;19 Suppl:43–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635945>
2. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: What can we learn? *Periodontol* 2000. 2015;68(1):122–

- 34.
3. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212–8.
4. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30(9):809–18. Available from: https://www.researchgate.net/publication/10581349_Dynamics_of_bone_tissue_formation_in_tooth_extraction_sites_An_experiment_in_dogs
5. Araújo MG, Lindhe J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(6):545–9.
6. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ. Spatial and temporal localization of transforming growth factor-B1, bone morphogenetic protein-2, and platelet-derived growth factor-A in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1061–72.
7. Olioso D, Marzotto M, Bonafini C, Brizzi M, Bellavite P. Arnica montana effects on gene expression in a human macrophage cell line. Evaluation by quantitative Real-Time PCR. *Homeopathy* [Internet]. 2016;105(2):131–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2016.02.001>
8. Ou M, Zhao Y, Zhang F, Huang X. Bmp2 and Bmp4 accelerate alveolar bone development. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2015;56(3):204–11. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604391254%5Cnhttp://dx.doi.org/10.3109/03008207.2014.996701%5Cnhttp://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=16078438&id=doi:10.3109%2F03008207.2014.996701&atitle=Bmp2+and+Bmp4+acc>
9. Akasaki Y, Matsuo K, Adachi K, Ishikawa A, Zhang M, Hosokawa R. Effects of thymosin β 10 and β 15 on wound healing in rat tooth extraction sockets. *J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol* [Internet]. 2014;26(3):280–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2013.02.007>
10. Baud'huin M, Solban N, Cornwall-Brady M, Sako D, Kawamoto Y, Liharska K, et al. A soluble bone morphogenetic protein type IA receptor increases bone mass and bone strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109(30):12207–12. Available

from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3409793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

11. Fisher JP, Lalani Z, Bossano CM, Brey EM, Demian N, Johnston CM, et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. *J Biomed Mater Res B*. 2004;68(3):428–38.
12. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008;35(7):630–9.
13. Ariga T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors* [Internet]. 2004;21(1–4):197–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630197>
14. Cho M La, Heo YJ, Park MK, Oh HJ, Park JS, Woo YJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. *Immunol Lett*. 2009;124(2):102–10.
15. Zhou DY, Du Q, Li RR, Huang M, Zhang Q, Wei GZ. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by downregulating inducible nitric oxide synthase. *Planta Med*. 2011;77(14):1575–81.
16. Li X, Xu L, Gao H, Li B, Cheng M. Effects of grape seed proanthocyanidins extracts on AGEs and expression of bone morphogenetic protein-7 in diabetic rats. *J Nephrol*. 2008;21(5):722–33.
17. Lee T, Kwon HS, Bang BR, Lee YS, Park MY, Moon KA, et al. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates allergic inflammation in murine models of asthma. *J Clin Immunol*. 2012;32(6):1292–304.
18. Zhou D-Y, Fang S-R, Zou C-F, Zhang Q, Gu W. Proanthocyanidin from grape seed extract inhibits airway inflammation and remodeling in a murine model of chronic asthma. *Nat Prod Commun*. 2015 Feb;10(2):257–62.
19. Lin X, Kong LN, Huang C, Ma TT, Meng XM, He Y, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/??-catenin pathway. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2015;25(2):311–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.009>
20. Hermenean A, Ardelean A, Stan M, Herman H, Mihali CV,

- Costache M, et al. Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2013;205(2):138–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.016>
21. Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, Kumazawa Y. Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of the Citrus flavonoid hesperidin. *Planta Med*. 2006;72(5):477–9.
 22. Wu F, Jiang L, He X, Zhu P, Li J. Effect of hesperidin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in HSC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2015 Jul;40(13):2639–43.
 23. Shi Y, Dai J, Liu H, Li R-R, Sun P-L, Du Q, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappaB activity in a murine model of asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009 Sep;87(9):729–35.
 24. Lou C, Zhang F, Yang M, Zhao J, Zeng W, Fang X, et al. Naringenin Decreases Invasiveness and Metastasis by Inhibiting TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7(12):1–9.
 25. Meng X-M, Zhang Y, Huang X-R, Ren G, Li J, Lan HY. Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- β /Smad signaling with the combination of asiatic acid and naringenin. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(35):36984–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741910/>
 26. Yan N, Wen L, Peng R, Li H, Liu H, Peng H, et al. Naringenin Ameliorated Kidney Injury through Let-7a/TGFBR1 Signaling in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2016;2016.
 27. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione C V, Vignoli JA, Barbosa DS, et al. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. *J Nat Prod*. 2015 Jul;78(7):1647–55.
 28. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Silva TCC, Caviglione C V., Bottura C, et al. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One*. 2016;11(1):1–21.
 29. Ke J-Y, Kliewer KL, Hamad EM, Cole RM, Powell KA, Andridge RR, et al. The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr Metab (Lond)* [Internet].

- 2015;12(1):1. Available from:
<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/12/1/1>
30. Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Abuohashish HM, Parmar MY, Ola MS, Al-Hosaini AA, et al. Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy. *Neurol Res.* 2015;37(10):924–33.
31. Zhang F, Dong W, Zeng W, Zhang L, Zhang C, Qiu Y, et al. Naringenin prevents TGF- β 1 secretion from breast cancer and suppresses pulmonary metastasis by inhibiting PKC activation. *Breast Cancer Res [Internet].* 2016;18(1):38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036297%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4818388>
32. Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(3):301–7.
33. Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis.* 2004;10(1):27–31.
34. Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dent Mater J [Internet].* 2004;23(2):67–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0917-2394\(04\)70008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0917-2394(04)70008-7)
35. Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):47–52.
36. Hohman EE, Weaver CM. A grape-enriched diet increases bone calcium retention and cortical bone properties in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2015;145(2):253–9.
37. Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5(2):162–9.
38. Woo YJ, Joo Y Bin, Jung YO, Ju JH, Cho M La, Oh HJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Exp Mol Med [Internet].* 2011;43(10):561–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH, et al. Grape-Seed Proanthocyanidin Extract as Suppressors of Bone

- Destruction in Inflammatory Autoimmune Arthritis. *PLoS One*. 2012;7(12).
40. Zhang Z, Zheng L, Zhao Z, Shi J, Wang X, Huang J. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. *J Toxicol Sci* [Internet]. 2014;39(5):803–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242411>
 41. Song Q, Shi Z, Bi W, Liu R, Zhang C, Wang K, et al. Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis. *J Orthop Sci*. 2015 Jan;20(1):196–204.
 42. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, Lebecque P, Davicco MJ, Coxam V, et al. Hesperetin stimulates differentiation of primary rat osteoblasts involving the BMP signalling pathway. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2010;21(5):424–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.017>
 43. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, Barron D, Urpi-Sarda M, Manach C, et al. Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem*. 2010;58(1):668–75.
 44. Habauzit V, Sacco SM, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Barron D, et al. Differential effects of two citrus flavanones on bone quality in senescent male rats in relation to their bioavailability and metabolism. *Bone* [Internet]. 2011;49(5):1108–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.030>
 45. Chiba H, Kim H, Matsumoto A, Akiyama S, Ishimi Y, Suzuki K, et al. Hesperidin prevents androgen deficiency-induced bone loss in male mice. *Phyther Res*. 2014;28(2):289–95.
 46. Ming LG, Lv X, Ma XN, Ge BF, Zhen P, Song P, et al. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenylnaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. *Endocrinology*. 2013;154(3):1202–14.
 47. Li N, Jiang Y, Wooley PH, Xu Z, Yang SY. Naringin promotes osteoblast differentiation and effectively reverses ovariectomy-associated osteoporosis. *J Orthop Sci*. 2013;18(3):478–85.
 48. Yu G, Zheng G, Chang B, Hu Q, Lin F, Liu D, et al. Naringin Stimulates Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells via Activation of the Notch Signaling Pathway. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1–8.

49. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447–55.
50. Smith LR, Barton ER. Collagen content does not alter the passive mechanical properties of fibrotic skeletal muscle in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2014;306(10):C889–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598364>
51. Ma L, Gao HQ, Li BY, Ma YB, You BA, Zhang FL. Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2007;49(5):293–8. Available from: <http://1.11.61.220>
52. Zhang Y, Shi H, Wang W, Ke Z, Xu P, Zhong Z, et al. Antithrombotic effect of grape seed proanthocyanidins extract in a rat model of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg*. 2011;53(3):743–53.
53. Long M, Zhang Y, Li P, Yang SH, Zhang WK, Han JX, et al. Intervention of grape seed proanthocyanidin extract on the subchronic immune injury in mice induced by aflatoxin B1. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):1–10.
54. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RMD. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Jul;460:240–52.
55. Davies J. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67(8):932–49.
56. Pang P, Shimo T, Takada H, Matsumoto K, Yoshioka N, Ibaragi S, et al. Expression pattern of sonic hedgehog signaling and calcitonin gene-related peptide in the socket healing process after tooth extraction. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;467(1):21–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.139>

CAPÍTULO IV

Bibliografía consultada

1. Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:43–61.
2. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: What can we learn? *Periodontol 2000*. 2015;68(1):122–34.
3. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212–8.
4. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30(9):809–18. Available from: https://www.researchgate.net/publication/10581349_Dynamics_of_bone_tissue_formation_in_tooth_extraction_sites_An_experiment_in_dogs
5. Araújo MG, Lindhe J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(6):545–9.
6. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ. Spatial and temporal localization of transforming growth factor-B1, bone morphogenetic protein-2, and platelet-derived growth factor-A in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1061–72.
7. Oliosio D, Marzotto M, Bonafini C, Brizzi M, Bellavite P. Arnica montana effects on gene expression in a human macrophage cell line. Evaluation by quantitative Real-Time PCR. *Homeopathy* [Internet]. 2016;105(2):131–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2016.02.001>
8. Ou M, Zhao Y, Zhang F, Huang X. Bmp2 and Bmp4 accelerate alveolar bone development. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2015;56(3):204–11. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604391254%5Cnhttp://dx.doi.org/10.3109/03008207.2014.996701%5Cnhttp://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=16078438&id=doi:10.3109%2F03008207.2014>.

- 996701&atitle=Bmp2+and+Bmp4+acc
9. Akasaki Y, Matsuo K, Adachi K, Ishikawa A, Zhang M, Hosokawa R. Effects of thymosin β 10 and β 15 on wound healing in rat tooth extraction sockets. *J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol* [Internet]. 2014;26(3):280–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2013.02.007>
 10. Baud'huin M, Solban N, Cornwall-Brady M, Sako D, Kawamoto Y, Liharska K, et al. A soluble bone morphogenetic protein type IA receptor increases bone mass and bone strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109(30):12207–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3409793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 11. Fisher JP, Lalani Z, Bossano CM, Brey EM, Demian N, Johnston CM, et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. *J Biomed Mater Res B*. 2004;68(3):428–38.
 12. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008;35(7):630–9.
 13. Ariga T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors* [Internet]. 2004;21(1–4):197–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630197>
 14. Cho M La, Heo YJ, Park MK, Oh HJ, Park JS, Woo YJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. *Immunol Lett*. 2009;124(2):102–10.
 15. Zhou DY, Du Q, Li RR, Huang M, Zhang Q, Wei GZ. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by downregulating inducible nitric oxide synthase. *Planta Med*. 2011;77(14):1575–81.
 16. Li X, Xu L, Gao H, Li B, Cheng M. Effects of grape seed proanthocyanidins extracts on AGEs and expression of bone morphogenetic protein-7 in diabetic rats. *J Nephrol*. 2008;21(5):722–33.
 17. Lee T, Kwon HS, Bang BR, Lee YS, Park MY, Moon KA, et al. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates allergic inflammation in murine models of asthma. *J Clin Immunol*. 2012;32(6):1292–304.
 18. Zhou D-Y, Fang S-R, Zou C-F, Zhang Q, Gu W.

- Proanthocyanidin from grape seed extract inhibits airway inflammation and remodeling in a murine model of chronic asthma. *Nat Prod Commun.* 2015 Feb;10(2):257–62.
19. Lin X, Kong LN, Huang C, Ma TT, Meng XM, He Y, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/??-catenin pathway. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2015;25(2):311–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.009>
 20. Hermenean A, Ardelean A, Stan M, Herman H, Mihali CV, Costache M, et al. Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2013;205(2):138–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.016>
 21. Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, Kumazawa Y. Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of the Citrus flavonoid hesperidin. *Planta Med.* 2006;72(5):477–9.
 22. Wu F, Jiang L, He X, Zhu P, Li J. Effect of hesperidin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in HSC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2015 Jul;40(13):2639–43.
 23. Shi Y, Dai J, Liu H, Li R-R, Sun P-L, Du Q, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappaB activity in a murine model of asthma. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Sep;87(9):729–35.
 24. Lou C, Zhang F, Yang M, Zhao J, Zeng W, Fang X, et al. Naringenin Decreases Invasiveness and Metastasis by Inhibiting TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One.* 2012;7(12):1–9.
 25. Meng X-M, Zhang Y, Huang X-R, Ren G, Li J, Lan HY. Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- β /Smad signaling with the combination of asiatic acid and naringenin. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(35):36984–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741910/>
 26. Yan N, Wen L, Peng R, Li H, Liu H, Peng H, et al. Naringenin Ameliorated Kidney Injury through Let-7a/TGFBR1 Signaling in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2016;2016.
 27. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione C V, Vignoli JA, Barbosa DS, et al. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the

- Skin of Hairless Mice. *J Nat Prod.* 2015 Jul;78(7):1647–55.
28. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Silva TCC, Caviglione C V., Bottura C, et al. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One.* 2016;11(1):1–21.
 29. Ke J-Y, Kliewer KL, Hamad EM, Cole RM, Powell KA, Andridge RR, et al. The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr Metab (Lond)* [Internet]. 2015;12(1):1. Available from: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/12/1/1>
 30. Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Abuohashish HM, Parmar MY, Ola MS, Al-Hosaini AA, et al. Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy. *Neurol Res.* 2015;37(10):924–33.
 31. Zhang F, Dong W, Zeng W, Zhang L, Zhang C, Qiu Y, et al. Naringenin prevents TGF- β 1 secretion from breast cancer and suppresses pulmonary metastasis by inhibiting PKC activation. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2016;18(1):38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036297> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4818388>
 32. Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(3):301–7.
 33. Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis.* 2004;10(1):27–31.
 34. Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dent Mater J* [Internet]. 2004;23(2):67–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0917-2394\(04\)70008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0917-2394(04)70008-7)
 35. Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):47–52.
 36. Hohman EE, Weaver CM. A grape-enriched diet increases bone calcium retention and cortical bone properties in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2015;145(2):253–9.
 37. Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed

- proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5(2):162–9.
38. Woo YJ, Joo Y Bin, Jung YO, Ju JH, Cho M La, Oh HJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Exp Mol Med [Internet].* 2011;43(10):561–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH, et al. Grape-Seed Proanthocyanidin Extract as Suppressors of Bone Destruction in Inflammatory Autoimmune Arthritis. *PLoS One.* 2012;7(12).
40. Zhang Z, Zheng L, Zhao Z, Shi J, Wang X, Huang J. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. *J Toxicol Sci [Internet].* 2014;39(5):803–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242411>
41. Song Q, Shi Z, Bi W, Liu R, Zhang C, Wang K, et al. Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis. *J Orthop Sci.* 2015 Jan;20(1):196–204.
42. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, Lebecque P, Davicco MJ, Coxam V, et al. Hesperetin stimulates differentiation of primary rat osteoblasts involving the BMP signalling pathway. *J Nutr Biochem [Internet].* 2010;21(5):424–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.017>
43. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, Barron D, Urpi-Sarda M, Manach C, et al. Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem.* 2010;58(1):668–75.
44. Habauzit V, Sacco SM, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Barron D, et al. Differential effects of two citrus flavanones on bone quality in senescent male rats in relation to their bioavailability and metabolism. *Bone [Internet].* 2011;49(5):1108–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.030>
45. Chiba H, Kim H, Matsumoto A, Akiyama S, Ishimi Y, Suzuki K, et al. Hesperidin prevents androgen deficiency-induced bone loss in male mice. *Phyther Res.* 2014;28(2):289–95.
46. Ming LG, Lv X, Ma XN, Ge BF, Zhen P, Song P, et al. The

- prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. *Endocrinology*. 2013;154(3):1202–14.
47. Li N, Jiang Y, Wooley PH, Xu Z, Yang SY. Naringin promotes osteoblast differentiation and effectively reverses ovariectomy-associated osteoporosis. *J Orthop Sci*. 2013;18(3):478–85.
48. Yu G, Zheng G, Chang B, Hu Q, Lin F, Liu D, et al. Naringin Stimulates Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells via Activation of the Notch Signaling Pathway. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1–8.

CAPÍTULO V

Metodologia expandida

Seleção da amostra:

Após aprovação do projeto pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer CONEP 740.532) e do Institutional Review Board, localizado na Universidade da Pensilvânia, EUA, foram selecionados pacientes adultos do sexo masculino, que necessitavam da extração de elemento dental e instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética. Foram excluídos os pacientes que apresentavam histórico de quimioterapia ou radioterapia de cabeça e/ou no pescoço, doença periodontal prévia, etílicos, história de terapia com bisfosfanatos, diabéticos descompensados, fumantes e/ou que apresentem qualquer contraindicação para cirurgia oral.

Os pacientes foram triados na clínica odontológica do Centro de Estudos em Implantes Dentários (CEPID) do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os pacientes submetidos à pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando sua participação e coleta dos dados clínicos e histológicos.

Foram formados três grupos de acordo com o tipo de fitoquímico utilizado:

- GRUPO 1 (GEU): Extrato de semente de uva [Proantocianidinas]
- GRUPO 2 (GTO): Extrato de semente de toranja [Naringenina/Hesperidina]
- GRUPO 3 (CON): Grupo controle [nenhum fitoquímico]

Cada modalidade de tratamento [PA, NA/HE e grupo controle] foi realizado em 10 pacientes, aleatoriamente distribuídos nos grupos. Pacientes do grupo GEU ingeriram 300mg do fitoquímico por 3 vezes ao dia (Grape Seed Extract, GNC, Pittsburg, PA, EUA) e os pacientes do grupo GTO ingeriram 250mg por 3 vezes ao dia (Grapefruit Seed Extract, Nature's Way, Springville, UT, EUA). Os pacientes do grupo controle não receberam nenhum fitoquímico. Os pacientes iniciaram a ingestão de fitoquímicos duas semanas antes da cirurgia de extração dental e mantiveram esse regime por mais oito semanas após a extração,

totalizando 10 semanas de uso, até o momento da instalação do implante.

Procedimentos cirúrgicos:

Cirurgia I – Extração dental e coleta material do alvéolo:

Antes da extração do elemento dental, cada paciente foi submetido aos procedimentos de assepsia intra-bucal com bochecho de solução de gluconato de clorexidina 0,12% (Periogard, Colgate, São Paulo, SP, Brasil), 15 ml, por 1 minuto e assepsia extra-bucal com digluconato de clorexidina 2% (Riohex 2%, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Anestesia local foi executada com cloridrato de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100,000 (Mepiadre 100, Nova DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), por meio de técnicas anestésicas infiltrativas e bloqueios regionais.

A exodontia foi realizada de maneira conservadora de modo a preservar as paredes remanescentes do alvéolo. Após curetagem intensa e irrigação copiosa do alvéolo, foi obtida a hemostasia e o local preenchido com uma membrana (Collagen Plug, Zimmer, Carlsbad, CA, EUA) e suturado com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para isolar o ferimento da cavidade oral. Os participantes foram instruídos quanto aos cuidados pós operatórios, incluindo medicação com paracetamol 750mg (Tylenol 750, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) a cada 8 horas durante 5 dias.

Após 24 horas da extração dos dentes, todos os pacientes retornaram para a coleta do material biológico para análise dos fatores de crescimento. Sob anestesia local, foi removida a sutura e a membrana Collagen Plug, juntamente com uma pequena quantidade do coágulo no interior do alvéolo. O local foi novamente suturado com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) após a remoção da amostra. Tal conduta poderá gerar pequeno desconforto pós-operatório, contudo o paciente já estará sob efeito de medicação analgésica. O espécime de biópsia foi imediatamente colocado em solução para estabilização do RNA (RNAlater, Ambion, Austin, TX, EUA), para o transporte evitando a degradação do material.

Cirurgia II – Biópsia óssea e instalação do implante dental:

Sessenta dias após a extração dental, os pacientes foram novamente chamados para novo procedimento cirúrgico. Cada paciente foi submetido ao mesmo protocolo cirúrgico de assepsia intra-bucal e

assepsia extra-bucal. Anestesia local foi executada por meio de técnicas anestésicas infiltrativas e bloqueios regionais. Um retalho de espessura total foi levantado e um espécime ósseo cilíndrico de 3mm por 6mm foi obtido pelo uso de uma broca trefina. As amostras ósseas foram colhidas e fixadas em paraformaldeído durante 3 dias a 4°C e então transferido para solução salina e armazenado a 4°C.

Imediatamente após a biópsia, os implantes (Cone Morse Universal II, Implacil De Bortoli, São Paulo, SP, Brasil) foram instalados conforme o protocolo estabelecido pela empresa e as condições ósseas avaliadas em tomografia computadorizada do Cone Beam. O área cirúrgica foi suturado com fio de seda trançado 4-0 (Seda 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para estabilizar o retalho.

Os participantes foram instruídos quanto aos cuidados pós operatórios, incluindo medicação com: amoxicilina 500mg (Amoxil 500, GSK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a cada 8 horas durante 7 dias; clindamicina 600mg (Dalancin C 300mg, Pzifer, Guarulhos, SP, Brasil) a cada 8 horas por 7 dias, se alérgico à penicilina; nimesulida 100mg (Scaflam 100, Mantecorp, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a cada 12 horas por 5 dias e paracetamol 750mg (Tylenol 750, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) a cada 8 horas durante 5 dias.

As suturas foram removidas 7 dias após a cirurgia e os pacientes foram acompanhados. Nenhum implante teve falha na osseointegração e todos os pacientes receberam a reabilitação protética.

Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR):

Isolamento RNA:

Amostras de tecidos foram colhidas e armazenadas em frascos Eppendorf *RNALater* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e congelado a -20°C. Durante o isolamento, todas as superfícies e instrumentos foram tratados com *RNase Away* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para evitar a degradação do RNA e contaminação de DNA. As amostras foram descongeladas e finamente picados com tesouras cirúrgicas limpas e transferido para um frasco Eppendorf sem RNase contendo 1ml de reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. O material lisado foi transferida para um homogeneizador *QIAshredder* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e centrifugado a 12.000g durante dois minutos. Material lisado homogeneizado foi transferido a

um frasco Eppendorf novo sem RNase contendo 200µL de clorofórmio (Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA), agitado vigorosamente durante 15 segundos, e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 minutos. As amostras foram em seguida centrifugadas a 12.000g durante 15 minutos a 4°C, resultando numa separação de 3 fases. A fase supra aquosa contendo RNA (cerca de 600µL) foi cuidadosamente pipetado e transferidos para um novo frasco Eppendorf. Um volume igual de etanol 70% em água deionizada livre de RNase foi adicionado a cada amostra e bem misturado por vórtex. RNA isolado foi purificado usando o kit de purificação de RNA *TRIzol Plus* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. 1µL de RNA purificado foi analisado com a *NanoDrop One^C* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para determinar rendimento e pureza do RNA.

Síntese de cDNA e qRT-PCR:

Bibliotecas de cDNA foram geradas utilizando o kit *Omniscript Reverse Transcriptase* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e *primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. 200ng de RNA purificado foi utilizado em cada reação de transcriptase reversa. qRT-PCR foi realizada em reações de 20µL em triplicatas usando 1µL de cDNA e kit *TaqMan Gene Expression Master Mix* com uracila-N glicosilase (UNG) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). *Primers TaqMan* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para os seguintes genes alvos foram analisados: proteína óssea morfogenética 4 (BMP-4), proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7), fator de crescimento transformante β1 (TGF-β1), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), interleucina 1-β (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), quimiocina ligante 2 (CXCL2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transcrição relacionados nanico 2 (RUNX2), fator de coagulação de protrombina II (F2) e fator de von Willebrand (VWF). Conforme recomendado pelo fabricante, o perfil térmico seguinte foi usado para reações de qRT-PCR em um sistema de detecção de sequencia *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): ativação UNG em 50°C durante 2 minutos, ativação polimerase em 95°C durante 10 minutos, PCR (40 ciclos) em 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Histologia óssea:

Coleta do tecido e preparação:

O tecido foi colhido e fixado em paraformaldeído durante 3 dias

a 4°C e então transferido para solução salina e armazenado a 4°C. Os tecidos foram desmineralizados em ácido etilenodiaminotetracético 0.5 M (EDTA) (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), pH 7.6, durante 9 semanas sob agitação suave contínua em um balanço a 4°C. EDTA foi trocado 3 vezes por semana. As amostras foram transferidas para solução salina nova e subsequentemente embebidos em parafina para seccionamento histológico.

Seis cortes seriados de espessura de 1µm foram montados para coloração histológica com hematoxilina e eosina (H&E), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), e picrosirius red (PSR). Previamente a todos os procedimentos de coloração, as secções foram desparafinadas em 3 trocas de xilenos (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 3 minutos, e reidratado numa série de etanóis (Decon Labs, King of Prussia, PA, EUA) diluições conforme a seguir, duas trocas a cada dois minutos: 100%, 95%, 80%, 70% e 50%. Após a conclusão de cada procedimento de coloração, amostras foram desidratadas numa série de diluições de etanóis conforme a seguir, uma troca a cada um minuto: 70%, 90% e 100%.

Finalmente, as amostras foram clarificadas, em 3 trocas de xileno durante 3 minutos cada. As amostras foram deixadas secar e montadas em lamínula usando duas gotas do meio de montagem Acrytol (Lieca Biosystems, Richmond, IL, EUA).

Hematoxilina e eosina (H&E):

Após desparafinização e reidratação, amostras de H&E foram coradas com Gill #3 hematoxilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 5 minutos e transferido para água de torneira corrente por um período adicional de 5 minutos. As amostras foram diferenciadas em ácido alcoólico 1% (1% 12N HCl (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em etanol 70% durante 5 minutos e seguido por água de torneira corrente durante 5 minutos. As amostras foram contrastadas durante 10 minutos em 0.5% w/v Eosin Y aquoso (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguido de uma lavagem de 5 minutos em água de torneira corrente. As amostras foram em seguida desidratadas e montadas para imagiologia.

Picrosirius Red (PSR):

Após desparafinização e reidratação, amostras de PSR foram coradas em solução de Sirius Red 0.1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) durante 30 minutos. As amostras foram então lavadas em 3 mudanças de

água de torneira acidificada (0.5% ácido acético glacial (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 5 minutos cada. As amostras foram então lavadas durante 90 minutos, em água da torneira antes de desidratar e montar para imagiologia.

Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP):

Tampão I, II, III e IV foram preparados como segue para a coloração TRAP. Tampão I: acetato de sódio 0.1M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido tartárico 0.05M L-(+) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água deionizada acidificada (2.8mL ácido acético glacial por 950mL de água). O pH final foi ajustado a 4,9 com hidróxido de sódio 5M (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Tampão II: fosfatase Naphthol AS-BI 0.05M em éter de etileno glicol monoetilico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Tampão III: nitrito de sódio 0.75M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água deionizada. Tampão IV: cloridrato de pararosnilina 0.15M em ácido clorídrico 2N (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) aqueceu-se a 60°C durante 5 minutos e filtrado através de papel Kimwipes (Kimberly-Clark, Irving, TX, EUA).

Duas jarras de Coplin foram cheios com 50ml de Tampão I e aqueceu-se a 37°C numa incubadora. Após desparafinação e reidratação, as amostras foram colocadas em água de torneira corrente por dois minutos seguido por água deionizada durante um minuto. 0.5mL de Tampão II foi adicionada a primeira jarra de Coplin contendo Tampão I e as amostras foram transferidas para a solução e incubou-se a 37°C durante uma hora. Após uma hora, 1mL do Tampão III e 1mL do Tampão IV foram misturados num tubo cônico e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante dois minutos antes de ser adicionado a segunda jarra de Coplin contendo 50ml de Tampão I fresca aquecida a 37°C. As amostras foram transferidas para a segunda jarra de Coplin e incubou-se a 37°C durante 12 minutos, seguido por 3 mudanças de água deionizada durante 2 minutos. 10-20µL de Gill #3 hematoxilina diluído 1:4 com água deionizada foi pipetada para cada secção de tecido por 3-5 segundos antes de ser transferido para a água corrente da torneira.

Por fim, as amostras foram enxaguadas com 2 trocas de água deionizada durante 2 minutos cada antes de ser desidratada, clareada em xilenos e montado para imagiologia.

Imagiologia:

As imagens das lâminas de H&E e PSR foram obtidas de um microscópio óptico Olympus BX61 (Center Valley, PA, EUA) a 4, 10 e

20 vezes de magnificação. As imagens das amostras de H&E foram obtidas em modo de campo claro e capturadas com a câmera digital Hamamatsu ORCA RC CMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japão) e velocidade controlada pelo software Velocity (Improvision, Coventry, Reino Unido). As imagens das amostras de PSR foram obtidas a partir de configurações idênticas para cada ampliação no modo de campo claro com um condensador de luz polarizada.

As imagens das amostras de TRAP foram obtidas de um microscópio óptico Olympus BX40 (Center Valley, PA, EUA) a 4, 10 e 20 vezes de magnificação em modo de campo claro e capturados com a câmera digital QColor3 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) com velocidade controlada pelo software QCapture Pro 7 (Q Imaging, Surrey, BC, Canada).

Análise estatística:

qRT-PCR

Os dados qRT-PCR foram processados usando o método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Expressão relativa média dos genes, *fold change* e desvio padrão foram determinados. Análise estatística foi realizada inicialmente usando *one-way ANOVA* para testar qualquer diferença significativa entre os grupos. Se os resultados foram significativos ($P \leq 0,05$), utilizou-se o teste *t* para determinar as diferenças específicas entre as médias (com correção de Bonferroni para considerar comparações múltiplas) para comparar as diferenças específicas entre os grupos.

Histologia óssea

Análise histomorfométrica foi realizada nas amostras de H&E e PSR para determinação da área óssea total e distribuição da intensidade do sinal de cor, respectivamente. As amostras de H&E e PSR foram capturadas em ampliação de 4 vezes e montadas em uma imagem composta de toda a amostra, criada pelo software Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

Nas imagens de H&E, um filtro binário da área de tecido total foi criado selecionando a área de tecido com a ferramenta de seleção rápida e convertendo em preto o tecido ósseo, com a área restante da seleção convertido em branco. As áreas dos filtros de tecidos foram calculadas no software ImageJ (NIH, Bethesda, MA, EUA) e a porcentagem de osso em cada amostra de tecido foi calculada.

As imagens de PSR foram analisados no ImageJ para calcular a distribuição da intensidade do sinal das cores vermelho/laranja e amarelo/verde. A ferramenta de limiar de cor foi utilizada no sistema de cores HSV para criar uma filtro binário de vermelho/laranja, amarelo/verde e sinais de cores totais. Todas as amostras foram fotografadas em configurações idênticas e filtros de limiar de cor aplicados nos mesmos níveis de corte. A porcentagem de sinal vermelho/laranja e amarelo/verde, regulado pelo sinal de cor total, foi calculada para cada amostra.

Nas imagens de TRAP, os osteoclastos foram contados em áreas com coloração TRAP positiva que também continham pelo menos dois núcleos. Os osteoclastos foram contados nas amostras com uma ampliação de 20 vezes para uma precisão melhorada e toda a amostra foi contada por exploração sistemática de toda a lâmina. A área óssea total foi mensurada da mesma maneira que as amostras de H&E para calcular a quantidade de osteoclastos por milímetro quadrado.

Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título: EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO EM HUMANOS

Pesquisador Responsável: Marco Aurélio Bianchini

Telefone para contato: (48) 3721-9077. Email: bian07@yahoo.com.br

Pesquisador participante: José Moisés Souza Júnior

Telefones para contato: (48) 37219077 / (48) 99510472

Email: dr.josemoises@hotmail.com

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEPSH):
Biblioteca Universitária Central - Setor de Periódicos (térreo). Telefone:
(48) 3721-9206. Horário de atendimento: das 10:00 hs – 12:00 hs e
14:00 hs – 16:00 hs de segunda a sexta feira.

O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos

Os pacientes selecionados para este estudo deverão ser do sexo masculino e apresentar dentes que necessitam da extração e posterior instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética implantossuportada.

A pesquisa será realizada no Centro de Estudos e Pesquisas em Implantes Dentários – CEPID; no Centro Cirúrgico da Universidade Federal de Santa Catarina – CCS – UFSC; e as análises laboratoriais serão realizadas no Institutional Review Board, localizado na Universidade da Pennsylvania, EUA.

O objetivo do estudo proposto é avaliar os efeitos da ingestão de fitoquímicos (extrato de semente de uva e extrato de semente de toranja, Vitamin Shoppe, NJ, EUA) na expressão genética dos fatores de crescimento. Ainda determinar se a exposição sistêmica contínua aos compostos, durante a cicatrização do sítio de extração, leva à formação

óssea de alta qualidade. Essas “melhoras” supostamente levariam a uma melhor função dos implantes e conseqüentemente maior longevidade da reabilitação implantossuportada. Os procedimentos necessários para pesquisa serão executados na seguinte sequência:

Etapa I: Os elementos dentais condenados serão extraídos e o alvéolo suturado (pontos). Após 24 horas da extração dos dentes, uma pequena quantidade de tecido mole localizada no interior do alvéolo será removida, sendo que o local será recoberto, após a remoção da amostra.

Etapa II: No dia 60 após a extração do elemento dental, uma pequena amostra de tecido localizada no interior do alvéolo será removida, e o implante será imediatamente instalado no mesmo local onde foi removida a amostra, não oferecendo nenhum prejuízo ou dano adicional ao paciente. Em todas as etapas serão adotadas medidas de biossegurança de rotina, bem como o emprego do protocolo anestésico e medicamentoso adequado.

Os principais riscos operatórios inerentes e potenciais aos procedimentos cirúrgicos incluem, mas não são limitados a eles, os seguintes:

1. Desconforto pós-operatório e edema que pode necessitar de alguns dias de recuperação
2. Sangramento continuado que pode ser prolongado.
3. Infecção pós-operatória que pode exigir tratamento adicional.
4. Restrição da abertura bucal por alguns dias ou semanas.
5. Estiramento da abertura bucal por alguns dias ou semanas.
6. Fratura de mandíbula.
7. Injúria ao nervo subjacente aos dentes, resultando em adormecimento ou formigamento do lábio, queixo, bochechas, gengiva, dentes e/ou língua do lado operado, que pode persistir por semanas, meses ou, em raras circunstâncias, permanente.
8. Comunicação com o seio maxilar (uma cavidade normal localizada acima dos dentes superiores), exigindo cirurgia adicional.
9. Rejeição a materiais implantados (implantes, membranas, materiais sintéticos)
10. Deiscência de sutura expondo a área operada.
11. Não osseointegração dos implantes com a inutilização dos mesmos. Caso ocorra, estes implantes serão repostos, ficando o

CEPID responsável por esta reposição, porém não haverá de **maneira alguma** devolução dos valores previamente combinados.

12. Necessidades de reintervenção cirúrgicas ou de um novo planejamento.

13. Os riscos inerentes aos procedimentos da coleta das amostras incluem apenas um aumento do desconforto pós-operatório, no momento da coleta 24 horas. Contudo o paciente já estará sob efeito de medicação analgésica.

Se qualquer condição não prevista acima ocorrer durante a cirurgia, confio no julgamento do aluno/professor/assistente – Marco Aurélio Bianchini e José Moisés de Souza Júnior – para realizar procedimentos adicionais (intervenções cirúrgicas, materiais, prescrição de medicação, tratamento de infecção) sem gastos adicionais. Entendo que serei ressarcido de todas as despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames.

Estou ciente de que medicamentos, drogas e anestésicos prescritos podem causar sonolência e dificuldade de atenção ou coordenação, e que alergias podem ser aumentadas com o uso concomitante de bebidas alcoólicas ou outros medicamentos. Portanto fui aconselhado (a) a não trabalhar e nem operar qualquer veículo ou dispositivos perigosos enquanto estiver sob vigência de medicamentos e /ou drogas até estar completamente recuperado do efeito dos mesmos, por, no mínimo, 24 horas após ter sido liberado da cirurgia e recuperado dos efeitos da medicação anestésica que me foi dada.

Entendo que durante a pesquisa, será cobrado apenas o valor dos implantes e materiais correspondentes a etapa protética. Não será cobrado o valor referente aos procedimentos de preservação alveolar (extração e adaptação da membrana). Estou ciente que, após a segunda etapa, serei encaminhado ao curso de Especialização em Implantodontia CEPID-UFSC para reabilitação protética e que deverei arcar com as despesas usuais de material complementar, laboratório de prótese e peças que serão utilizadas na futura prótese.

Compreendo que os tratamentos relativos à Implantodontia envolvem 2 (duas) fases: 1ª fase – cirúrgica e 2ª fase – protética. A fase protética deverá se iniciar, no mínimo 6 meses após a terceira etapa cirúrgica. O intervalo destas fases depende do diagnóstico e planejamento do meu caso, além da disponibilidade de alunos para a realização do tratamento em tempo hábil. Sendo assim, o período necessário para a realização de todos os procedimentos em Implantodontia pode variar entre 2 a 4 anos.

Certifico que tive oportunidade de ler e entender completamente os termos e palavras contidas no texto acima e me foram dadas explicações referentes a ele e que todos os itens ou declarações foram preenchidos no momento. Também declaro que sei ler e escrever português.

Eu, _____, abaixo assinado, fui informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____ - _____ / _____ / _____

Assinatura do Sujeito (participante): _____

Assinatura do pesquisador Responsável: _____

Parecer consubstanciado da CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO EM HUMANOS

Pesquisador: Marco Aurélio Bianchini

Área Temática: Genética Humana: (Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro); Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 4

CAAE: 09884612.4.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 740.532

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO "Vários compostos que estão presentes em plantas e alimentos, têm sido indicados para uma grande variedade de problemas de saúde como inflamação, bacteremia e câncer 3-6. Muitos compostos naturais são conhecidos por terem efeitos positivos sobre a resistência

do colágeno, massa de tecido e proliferação das células. Desses compostos, os três têm demonstrado potencial para reduzir a digestão/degradação do colágeno: extrato de semente de uva (contendo proantocianidinas, PA), extrato da planta gardênia (contendo genipin, GE) e extrato de toranja (contendo hesperidina, HE e naringenina, NA). No entanto, seus efeitos sobre a organização de ligações cruzadas na matriz, bem como a função nas células não foram claramente investigados. Com base nos efeitos positivos relatados acima, sugere-se que os efeitos dos primeiros mecanismos moleculares sobre a expressão do fator de crescimento e da qualidade de matriz de colágeno podem afetar a formação óssea significativamente, em longo prazo. Enquanto há apoio para se recomendar dietas ricas em nutrientes provenientes de frutas e legumes, são limitadas as evidências de que fitoquímicos possam ter algum efeito fisiológico significativo. Isto se justifica, especialmente, pela baixa biodisponibilidade após ingestão. Há uma escassez de pesquisas que demonstrem como a biodisponibilidade aumentada (através da suplementação) poderá afetar o corpo humano e, também os mecanismos de ação. Deste modo, pesquisas que objetivam avaliar as atividades biológicas de fitoquímicos se justificam. Entre os suplementos fitoquímicos mais consumidos são os compostos fenólicos (a partir de frutas e vegetais) e as terpins (de plantas). Compostos fenólicos ou flavonoides são sub-classificados como antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavonoides, flavonas e isoflavonas. Um dos flavonoides mais populares disponíveis comercialmente é o de extrato de semente de uva, o qual é uma mistura de flavonoides chamados proantocianidinas (PA) em forma de monômeros e polímeros (também em maçãs, uvas, vinho tinto e chocolate). O extrato de semente de uva tem sido amplamente utilizado com a promessa de ser antimicrobiano, prevenir a inflamação e proteger o sistema cardiovascular. Recentemente, observou-se que o PA é um agente de ligações cruzadas do colágeno tipo I, que não impede, porém a colonização bacteriana da dentina. Outro composto fenólico disponível comercialmente é a flavanona (presente em frutos cítricos). HE e NA, ambas as flavanonas no extrato de toranja, foram estudados em células. HE foi demonstrada estimular a diferenciação dos osteoblastos por meio de ativação das funções da proteína morfogenética óssea (BMP), enquanto que NA foi demonstrada melhorar a massa óssea em ratos por meio de injeções intra-gástricas. O outro grupo popular de fitoquímicos utilizado em aplicações na saúde é de terpins. Neste grupo, a genipin (GE), que é derivada da fruta Gardênia jasminoides Ellis, é considerada o composto mais extensamente estudado. A investigação neste composto tem-se

concentrado na sua capacidade de gerar ligações cruzadas em materiais de enxerto, além do seu extenso uso no tratamento da hipertensão e prevenção da diabetes. Por tudo isso, PA, GE e HE/NA poderiam ser utilizados em condições fisiológicas e/ou patológicas (na melhora da resistência óssea mecânica e a degradação o enzimática por meio da ligação cruzada do colágeno; e na melhora das funções celulares através da disponibilidade de fatores de crescimento) e supostamente levariam a uma melhor função e conseqüentemente qualidade de vida. No campo de Periodontologia e Implantologia, fitoquímicos podem resultar em melhoria da remodelação óssea, redução do progresso da doença periodontal por meio do amadurecimento da matriz colágena, regular secreção de fatores de crescimento, e muitas outras funções ainda não reveladas. Diante disso o objetivo do projeto proposto é avaliar os efeitos da ingestão de PA, GE e HE/NA na expressão genética dos fatores de crescimento. Ainda determinar se a exposição sistêmica contínua aos compostos, durante a cicatrização do sítio de extração, leva à formação óssea de alta qualidade. Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, localizado na Universidade Federal de Santa Catarina, e do Institutional Review Board, localizado na Universidade da Pennsylvania, EUA, serão selecionados pacientes adultos do sexo masculino, que necessitam da extração do elemento dental e instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética. Os pacientes selecionados para o estudo serão distribuídos em quatro (04) grupos de acordo com o tipo de fitoquímico utilizado: GRUPO 1: Extrato de semente de uva [PA]; GRUPO 2: Extrato de Gardênia [GE]; GRUPO 3: Extrato de Toranja [NA / HE] e; GRUPO 4: Grupo controle (nenhum fitoquímico/tratamento, NTx) Cada tratamento [PA, GE, NA / HE, e grupo controle (NTx)] será realizado em 10 alvéolos pós-extração. Cada paciente deverá ingerir 125 MG do fitoquímico específico 3 vezes ao dia com refeições (extrato de semente de uva [PA], extrato de gardênia [GE], e extrato de toranja [NA/HE], Vitamin Shoppe, NJ, EUA), duas semanas antes da cirurgia e manter esse regime durante oito semanas após a extração (10 semanas totais) até o momento da instalação do implante. Amostras serão coletadas no interior do alvéolo - no dia da extração (amostra 1) e após 60 dias da extração (amostra 2). AMOSTRA 1 O espécime de biópsia será imediatamente colocado em RNAlater (Qiagen, CA, EUA), para o transporte evitando a degradação do material. O RNA será extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, California, EUA) e 2 µg de RNA total, irá ser convertido em cDNA usando o kit da transcriptase reversa Omniscript kit (Qiagen). PCR quantitativo (qRT-PCR) será realizado

utilizando os iniciadores de sequência específica para os fatores de crescimento de BMP-4 (Hs01041266_m1, Applied Biosystems, CA, EUA), BMP-7 (Hs00233476_m1, Applied Biosystems), o TGF-beta (Hs00998133_m1, Applied Biosystems) e PDGF (Hs00964426_m1, Applied Biosystems). As reações serão preparadas e analisadas em triplicado por Applied Biosystems StepOnePlus™ (Applied Biosystems). O nível de expressão de mRNA dos genes de interesse serão calculados em relação à gliceraldeído-3-desidrogenase (GAPDH) (Hs02758991_g1, Applied Biosystems) e os dados serão analisados pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$ método CT 21. Os participantes serão acompanhados durante todo o período de cicatrização. AMOSTRA 2 Cada espécime será colocado em formalina tamponada a 10% durante três dias e depois desmineralizado com 0,5 M EDTA pH 7,4, durante quatro semanas. As amostras serão desidratadas em várias gradações ascendentes de etanol (50-100%), embebido em xilol e embebidos em parafina. Secções de 6 microm de cada bloco de parafina serão cortadas utilizando um micrótomo Leica RM204 Jung (Leica, Alemanha). As secções serão manchadas pelo tricrômico de Masson para avaliação histomorfométrica e por Picrosirius Red (PSR) para avaliar a organização do colágeno e maturação. A quantificação de cores da PSR será feito pelo software Image J (NIH, MA, EUA). Dados de PCR serão quantificados por One-Way ANOVA e pelo teste de Kruskal Wallis PSR (JMP, SAS, NC, EUA). A compreensão de como agem esses agentes naturais poderia abrir caminho para desenvolvê-las em terapias para remodelação do tecido em periodontia e outras áreas clínicas."

HIPÓTESE: "Compostos naturais ou fitoquímicos têm sido amplamente utilizados no tratamento de diversas patologias desde a bacteremia até o câncer. In vitro, observa-se que alguns compostos afetam a proliferação de células, aumentam a massa de tecido e promovem a ligação cruzada do colágeno no tecido conjuntivo. Os mecanismos por trás dessas funções ainda não foram descobertos e as pesquisas estão apenas nos seus passos iniciais. Diante de tais efeitos positivos observados in vitro e a disponibilidade de tais compostos para o consumo humano, o efeito de doses fisiológicas em células e matriz tecidual in vivo devem ser exploradas. Com base nos dados atuais, pode-se supor que certos compostos naturais afetam osso não só pela sua capacidade não enzimática de criar ligações cruzadas no colágeno, mas também pela capacidade de alteração das respostas celulares como mudanças na disponibilidade de fatores de crescimento. Este estudo piloto irá abordar os seguintes objetivos específicos: 1. Seres humanos

irão ingerir compostos naturais diariamente antes da extração dental até a colocação do implante dentário. Através de biópsias de tecido conjuntivo alveolar/osso, alguns fatores de crescimento importantes para a manutenção e reparação, ou seja, proteína morfogenética óssea (BMP) 4 e 7, fator de transformação do crescimento (TGF)-beta, e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) irá ser testada por meio de expressão dos genes 24 hs após extração dentária. 2. Qualidade óssea será acessada antes da colocação do implante no dia 60, por meio de análises histológicas de colágeno. A compreensão de como agem esses agentes naturais poderia abrir caminho para desenvolvê-las em terapias para remodelação do tecido em periodontia e outras áreas clínicas."

METODOLOGIA: "Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, localizado na Universidade Federal de Santa Catarina, e do Intitucional Review Board, localizado na Universidade da Pennsylvania, EUA. Os pacientes serão triados na clínica odontológica do Centro de Estudos em Implantes Dentários "CEPID" situada na Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os pacientes submetidos à pesquisa assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando sua participação e coleta dos dados clínicos e histológicos.Serão formados quatro (04) grupos de acordo com o tipo de fitoquímico utilizado: GRUPO 1: Extrato de semente de uva [PA], GRUPO 2: para vermelho representa matriz compacta, madura e organizada 22. Dados de PCR serão quantificados por One - Way ANOVA e pelo teste de Kruskall Wallis PSR (JMP, SAS, NC, EUA)."

Crterios de Inclusão: "Serão selecionados pacientes adultos do sexo masculino, que necessitam da extração do elemento dental e instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética implantossuportada."

Crterios de Exclusão: "Serão excluídos os pacientes que apresentem histórico de quimioterapia ou radioterapia de cabeça e/ou no pescoço 24 meses antes da primeira consulta, doença periodontal prévia, pacientes etílicos, história de terapia de bisfosfanatos, diabéticos descompensados, pacientes fumantes e/ou que apresentem qualquer contraindicação para cirurgia oral."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: "Determinar se a exposição sistêmica contínua aos compostos, durante a cicatrização do sítio de extração, leva à formação óssea de alta qualidade."

Objetivos Secundários: "Avaliar os efeitos da ingestão de PA, GE e HE/NA na expressão genética dos fatores de crescimento."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Os riscos da pesquisa ficam relacionados aos riscos operatórios das etapas 1 e 2. Os principais riscos operatórios inerentes e potenciais ao procedimento incluem, mas não são limitados a eles, os seguintes: 1.Desconforto pós-operatório e edema que pode necessitar de alguns dias de recuperação. 2. Sangramento continuado que pode ser prolongado.

3. Infecção pós-operatória que pode exigir tratamento adicional.

4.Restrição da abertura bucal por alguns dias ou semanas. 5. Estiramento da abertura bucal por alguns dias ou semanas.

6. Injúria ao nervo subjacente aos dentes, resultando em adormecimento ou formigamento do lábio, queixo, bochechas, gengiva, dentes e/ou língua do lado operado,que pode persistir por semanas,meses ou, em raras circunstâncias, permanente. 7. Comunicação com o seio maxilar (uma cavidade normal localizada acima dos dentes superiores), exigindo cirurgia adicional. 8. Rejeição a materiais implantados implantes,membranas, materiais sintéticos). 9. Deiscência de sutura expondo a área operada. 10. Necessidades de reintervenção cirúrgicas ou de um novo planejamento.Como todos os pacientes recrutados nesse estudo receberão implantes orais, pode-se considerar que todos sejam beneficiados pela melhora da qualidade óssea - pela ingestão dos fitoquímicos. Ainda não haverá nenhum custo referente aos procedimentos de preservação alveolar (membranas e materiais para regeneração óssea)."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um recurso, com o objetivo de responder às pendências não atendidas ou parcialmente atendidas, sendo elas: 2,6A, 6B, 6C, 6E, 6F, 6I, 6K e 8.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

RECURSO AO PARECER CONSUBSTANCIADO CONEP N° 670993:

1. Como as análises laboratoriais serão desenvolvidas na Universidade da Pensilvânia e, no caso serão feitas análises de expressão gênica, deve ser incluída a Área Temática Especial de "Genética Humana", na qual haverá envio e armazenamento de material genético ao exterior. Solicita-se adequação. RESPOSTA: Corrigido.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro detalhado, que especifique todos os recursos, fontes e destinação, em especial os custos operacionais (recursos humanos e materiais), bem como qual é a fonte financiadora. RESPOSTA: Materiais de Consumo (Orçamento). Vide documento "NOVO. EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA ESTUDO EM HUMANOS.doc"

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. No orçamento apresentado, não consta a previsão de ressarcimento aos participantes da pesquisa. Ademais, nada é informado sobre o custo do implante, e em especial sobre a reposição do implante perdido (caso ocorra), durante a fase de osteointegração, visto que a membrana utilizada não é efetiva pra impedir a invasão de tecido.

RECURSO: • O valor estimado de ressarcimento dos participantes da pesquisa foi adicionado ao orçamento • Quanto aos custos dos implantes e reposição, em caso de perda, informo que será de responsabilidade do Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes dentários, localizado na Universidade Federal de Santa Catarina conforme o TCLE que foi corrigido... “Não será cobrado nenhum valor referente aos procedimentos da pesquisa. Após a realização da pesquisa o(s) implante(s) será (ao) imediatamente instalado (s) pelos alunos do curso de Especialização de Implantodontia CEPID-UFSC e você deverá arcar com as despesas dos implantes e reabilitação protética, repassadas pelo CEPID-UFSC”. ANÁLISE DO RECURSO: • No arquivo “EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA. RECURSO.docx” consta o valor estimado para despesas com pacientes. Uma vez que a pesquisa objetiva a) avaliar os efeitos da ingestão de PA, GE e HE/NA na expressão genética dos fatores de crescimento. e b) determinar se a exposição sistêmica contínua aos

compostos, durante a cicatrização do sítio de extração, leva à formação óssea de alta qualidade e para isso os pesquisadores irão recrutar participantes que necessitam de exodontia e posterior instalação de implantes, a instalação destes não são de responsabilidade dos pesquisadores. RECURSO ATENDIDO.

3. Quanto ao cronograma apresentado, o mesmo não está adequado, pois informa que o estudo já teve início. Solicita-se esclarecimento e, caso necessário, adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que o mesmo ainda se encontra em análise no sistema CONEP/CEP até a presente data.

RESPOSTA: CRONOGRAMA. Vide documento "NOVO. EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA ESTUDO EM HUMANOS.doc" ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Não está claro no Protocolo se o procedimento de colocação do implante será realizado imediatamente após a biópsia do dia 60. Solicita-se esclarecimento. RESPOSTA:...4.3.2 Etapa II: No dia 60 da extração do elemento dental, sob anestesia, um retalho de espessura total será levantado e um espécime cilíndrico de 3 mm será obtido pelo uso de uma trefina, antes da colocação do implante. Imediatamente após a biópsia, os implantes serão instalados conforme o protocolo estabelecido no item cirurgia II desse projeto, sem nenhum risco adicional ao paciente. ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Os procedimentos experimentais implicam em riscos. A biópsia a se realizar 24 horas após a exodontia e a do dia 60 trarão riscos? Quais? Solicita-se esclarecimentos. RESPOSTA: ...4.3.1 Etapa I: Após 24 horas da extração dos dentes, sob anestesia local, a membrana collatape será perfurada para acessar o tecido subjacente. Posteriormente, uma pequena quantidade de tecido mole localizada no interior do alvéolo será removida com auxílio de perfurador de tecido de 4mm (Salvin, NC, EUA). O local será recoberto com Collaplug (Cimmer, CA, EUA), após a remoção da amostra. Tal conduta poderá gerar pequeno desconforto pós-operatório, contudo o paciente já estará sob efeito de medicação analgésica. 4.3.2 etapa II: No dia 60 da extração do elemento dental, sob anestesia, um retalho de espessura total será levantado e um espécime cilíndrico de 3 mm será obtido pelo uso de uma trefina, antes da colocação do implante. Imediatamente após a biópsia, os implantes serão instalados conforme o protocolo estabelecido no item cirurgia II desse projeto, sem nenhum risco adicional ao paciente....

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

a) Os três primeiros parágrafos estão em forma de declaração, ao invés de estar sendo o participante da pesquisa convidado a participar do estudo. Essa forma de apresentação não pode ser aceita. O consentimento deve ser solicitado em forma de convite, esclarecendo em linguagem acessível todos os procedimentos e garantias (Resolução CNS 466/12, item IV) para, ao final, o participante declarar que está de acordo. Deve-se garantir que o participante da pesquisa possui o direito de retirar o consentimento sem sofrer qualquer tipo de penalização. É inadequado começar com "por mim assinado, autorizo...". Esses parágrafos devem finalizar o TCLE. No corpo do documento as frases "dou pleno consentimento...", "Fui informado..." devem ser substituídas por afirmações do pesquisador e não do participante da pesquisa. Esse procedimento pode confundir o participante e comprometer sua autonomia. Solicita-se adequação. RESPOSTA: Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Informações sobre a pesquisa:

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Ainda no TCLE podem ser identificados trechos onde foi utilizada a primeira pessoa. Como exemplo é possível citar: "Se qualquer condição não prevista acima ocorrer durante a cirurgia, confio..."; "Entendo que serei ressarcido de todas as despesas decorrentes da participação..."; "Estou ciente de que medicamentos, drogas, e anestésicos prescritos podem causar sonolência..."; "...Portanto, fui aconselhado(a) a não trabalhar..."; "Entendo que durante a pesquisa, será cobrado apenas o valor dos implantes..."; "... Estou ciente que após a segunda etapa, serei encaminhado ao curso..."; "Compreendo que os tratamentos

RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE.... "Se qualquer condição não prevista acima ocorrer durante a cirurgia, você deverá confiar no julgamento do aluno/professor/assistente – Marco Aurélio Bianchini e João Gustavo Oliveira de Souza – para realizar procedimentos adicionais (intervenções cirúrgicas, materiais, prescrição de medicação, tratamento de infecção) sem gastos adicionais. Você será ressarcido de todas as despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Você de verá estar ciente de que medicamentos, drogas e anestésicos prescritos podem causar sonolência

e dificuldade de atenção ou coordenação, e que alergias podem ser aumentadas com o uso concomitante de bebidas alcoólicas ou outros medicamentos. Portanto você será aconselhado (a) a não trabalhar e nem operar qualquer veículo ou dispositivos perigosos enquanto estiver sob vigência de medicamentos e /ou drogas até estar completamente recuperado do efeito dos mesmos, por, no mínimo, 24 horas após ter sido liberado da cirurgia e recuperado dos efeitos da medicação anestésica que me foi dada. Não será cobrado nenhum valor referente aos procedimentos da pesquisa. Após a realização da pesquisa o(s) implante(s) será (ao) imediatamente instalado (s) pelos alunos do curso de Especialização de Implantodontia CEPID-UFSC e você deverá arcar com as despesas dos implantes e reabilitação protética, repassadas pelo CEPID-UFSC. Você teve a oportunidade de ler e entender completamente os termos e palavras contidas no texto acima e foram dadas explicações referentes a todos os itens ou declarações acima. Você declara que sabe ler e escrever em português. É importante salientar que a pesquisa tem o objetivo de avaliar tanto os efeitos da ingestão de PA, GE e HE/NA na expressão genética dos fatores de crescimento, quanto determinar se a exposição sistêmica contínua aos compostos, durante a cicatrização do sítio de extração, leva à formação óssea de alta qualidade. Nesse contexto informamos que a etapa de instalação dos implantes e confecção da prótese são etapas que não correspondem à pesquisa..... Estas etapas serão realizadas no mesmo local (Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários, UFSC) pelo curso de Especialização em Implantodontia. ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

b) Cabe lembrar que o TCLE é o documento onde o pesquisador deve prestar todas as informações pertinentes ao protocolo para os participantes da pesquisa de maneira clara e objetiva. Além disso, por utilizar linguagem técnica, fora do alcance da população comum, não cabe indicar os procedimentos técnicos envolvidos, razão pela qual solicita-se adequação do documento como um todo. RESPOSTA: Todo o TCLE foi corrigido com linguagem adequada.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. No TCLE ainda constam termos técnicos como, por exemplo: expressão genética dos fatores de crescimento; exposição sistêmica; sítio de extração; longevidade da reabilitação implantossuportada; MEMBRANA será posicionada de modo a recobrir o ALVÉOLO; pequena quantidade de tecido mole; interior do alvéolo; biossegurança; protocolo anestésico; riscos operatórios inerentes; procedimentos cirúrgicos; pós-operatório; edema;

infecção; Estiramento da abertura bucal; INJÚRIA ao nervo SUBJACENTE aos dentes; Deiscência de sutura; osseointegração; reintervenção cirúrgicas; intervenções cirúrgicas; prescrição de medicação; etapa protética.

RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE. “O objetivo do estudo proposto é avaliar os efeitos da ingestão de fitoquímicos (extrato de semente de uva [PA], extrato de gardênia [GE], e extrato de toranja [NA/HE], Vitamin Shoppe, NJ, EUA) nos fatores que estão relacionados ao aumento de quantidade e qualidade óssea. Ainda determinar se a exposição sistêmica contínua aos compostos, durante a cicatrização do local da extração, leva à formação óssea de alta qualidade. Essas “melhoras” supostamente levariam a uma melhor função dos implantes e conseqüentemente maior longevidade dos implantes e respectivas próteses. Os procedimentos necessários para pesquisa serão executados na seguinte sequência:

Etapa I: Os elementos dentais condenados serão extraídos e uma película (membrana) será posicionada de modo a recobrir o local da extração. Após 24 horas da extração dos dentes, uma pequena quantidade de gengiva localizada no interior do local da extração será removida, sendo que o local será recoberto, após a remoção da amostra.

Etapa/Cirurgia II No dia 60 após a extração do elemento dental, uma pequena amostra uma pequena quantidade de gengiva localizada no interior do local da extração será removida, e o implante será imediatamente instalado pelos alunos do Curso de Especialização em Implantodontia, no mesmo local onde foi removida a amostra, não oferecendo nenhum prejuízo ou dano adicional ao paciente. Todas as etapas serão realizadas em ambiente limpo, com anestesia e medicamentos adequados. Os principais riscos dos procedimentos cirúrgicos incluem, mas não são limitados a eles, os seguintes: 1.Desconforto após a cirurgia e “inchaço” que pode necessitar de alguns dias de recuperação 2.Sangramento continuado que pode ser prolongado. 3.Contaminação após a cirurgia que pode exigir tratamento adicional. 4.Diminuição da abertura bucal por alguns dias ou semanas. 5.Pequeno corte no canto da boca por alguns dias ou semanas. 6.Fratura de mandíbula. 7.Trauma ao nervo próximo dos dentes, resultando em adormecimento ou formigamento do lábio, queixo, bochechas, gengiva, dentes e/ou língua do lado operado, que pode persistir por semanas, meses ou, em raras circunstâncias, permanente. 8.Comunicação com o seio maxilar (uma cavidade normal localizada acima dos dentes

superiores), exigindo cirurgia adicional. 9.Rejeição a materiais (membranas, materiais sintéticos) 10.Afrouxamento da sutura “pontos” expondo a área operada. 11.Necessidades de outras cirurgias ou de um novo planejamento. Os riscos dos procedimentos da coleta das amostras incluem apenas um aumento do desconforto após a cirurgia, no momento da coleta 24 horas. Contudo você já estará sob efeito de medicação analgésica.

ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

c) Não é informado que está garantido o ressarcimento de gastos relacionados ao estudo. Cabe ressaltar que, como prevê o item IV.3.g da Resolução CNS 466/12, deve ser garantido ao participante da pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Assim sendo, solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo.

RESPOSTA:...Entendo que serei ressarcido de todas as despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames... ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. A garantia de ressarcimento foi dada, mas deve ser descrita na terceira pessoa.

RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE: “Você será ressarcido de todas as despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames” ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

d) Não há menção ou restrição de participação de pessoas grávidas ou que venham a engravidar durante a referida pesquisa. Solicita-se adequação. RESPOSTA:...Os pacientes selecionados para este estudo deverão ser do sexo masculino e apresentar dentes que necessitam da extração e posterior instalação de implantes orais, de modo a possibilitar a reabilitação protética implantossuportada...

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

e) Adicionalmente, não consta no TCLE quais seriam as medidas adotadas pelo pesquisador responsável e pela instituição, quanto aos casos de eventos adversos e possíveis danos/lesões aos participantes da pesquisa. Solicita-se adequação. RESPOSTA:...Se qualquer condição não prevista acima ocorrer durante a cirurgia, confio no julgamento do aluno/professor/assistente – Marco Aurélio Bianchini e João Gustavo

Oliveira de Souza – para realizar procedimentos adicionais (intervenções cirúrgicas, materiais, prescrição de medicação, tratamento de infecção) sem gastos adicionais... ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Embora os pesquisadores tenham descrito as medidas que serão adotadas em casos de intercorrências, o texto deve ser escrito na terceira pessoa. RECURSO:

Este item foi corrigido no TCLE: Se qualquer condição não prevista acima ocorrer durante a cirurgia, você deverá confiar no julgamento do aluno/professor/assistente – Marco Aurélio Bianchini e João Gustavo Oliveira de Souza – para realizar procedimentos adicionais (outras cirurgias, materiais, prescrição de medicação, tratamento de infecção “contaminação”) sem gastos adicionais. ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

f) Considerando que o participante da pesquisa tem direito ao sigilo e à confidencialidade e a equipe de pesquisa tem o dever de garanti-los, deve constar no TCLE de modo claro e afirmativo que será assegurada a garantia de sigilo, de acordo com as normas brasileiras, com a descrição dos procedimentos para tal, ou seja, como os dados serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável pelos cuidados do participante do estudo para qualquer outra instância, sejam outros pesquisadores ou o patrocinador, se for o caso. Solicita-se adequação

RESPOSTA: ...A pesquisa será realizada no centro de estudos e pesquisas em implantes dentários – CEPID; no centro cirúrgico da Universidade Federal de Santa Catarina – CCS – UFSC; e as análises laboratoriais serão realizadas no Institutional Review Board, localizado na universidade da Pennsylvania, EUA. ...Certifico que tive oportunidade de ler e entender completamente os termos e palavras contidas no texto acima e me foram dadas explicações referentes a ele e que todos os itens ou declarações foram preenchidos no momento. Também declaro que sei ler e escrever português. Eu, _____, abaixo assinado, fui informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Local e data

_____/_____/_____/_____/...Não haverão outros pesquisadores ou patrocinadores envolvidos no trabalho.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Não está claro no TCLE como os dados obtidos serão anonimizados antes de serem enviados à Universidade da Pennsylvania - EUA.

RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE: Antes de serem enviados à Universidade da Pennsylvania – EUA seus dados receberão um código com as iniciais do primeiro e último nome a fim de preservar sua identidade ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

g) Deve ser informado que o mesmo será elaborado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa (Resolução CNS 466/12 itens IV.3.f e IV.5.d). Solicita-se adequação. RESPOSTA: Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Informações sobre a pesquisa:

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

h) Não foi apresentada nenhuma forma de contato com o CEP responsável pelo acompanhamento do estudo ou com o pesquisador responsável. Solicita-se que seja incluso no TCLE uma breve descrição do que é o CEP, qual sua função no estudo, seu endereço, horário de funcionamento e as suas formas de contato. Solicita-se adequação.

RESPOSTA:Título: EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO EM HUMANOS. Pesquisador Responsável: Marco Aurélio Bianchini Telefone para contato: (48) 37219077. email: bian07@yahoo.com.br Pesquisador Participante: João Gustavo Oliveira de Souza telefones para contato: (48) 37219077 / (48) 96590009. Email: joaogustavo_s@hotmail.com Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEPSH): Biblioteca Universitária Central -Setor de Periódicos (térreo). Telefone: (48) 37219206. Horário de atendimento: das 10:00 hs – 12:00 hs e 14:00 hs – 16:00 hs de segunda a sexta-feira. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

i) De acordo com a Resolução CNS no 466/12, item IV.3.d, no TCLE, o pesquisador deve garantir que o participante da pesquisa possui o direito de retirar o consentimento sem sofrer qualquer tipo de penalização. Solicita-se adequação. RESPOSTA:...Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Apesar de constar no texto a garantia do participante retirar seu consentimento a qualquer momento, o texto está escrito na primeira pessoa. Considerando que o TCLE é um documento onde todos os pontos e questões relativas à pesquisa que está sendo proposta serão apresentados pelo pesquisador aos participantes, estas informações devem ser registradas na terceira pessoa.

RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE: O participante tem garantido o sigilo das informações e que pode retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento. ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

j) O Investigador Principal, ao assinar o TCLE, garante ao participante da pesquisa em seu nome e da Instituição de Pesquisa, todos os direitos elencados no documento. Assim sendo, ao "aluno" não cabe assinar o TCLE na qualidade de quem é responsável pela pesquisa. Portanto, solicita-se que o pesquisador responsável ou a pessoa por ele delegada deve assinar o TCLE. Solicita-se adequação

RESPOSTA: ...Eu, _____, abaixo assinado, fui informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Local e data _____/_____/_____/_____/ Assinatura do sujeito (participante): _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

k) O TCLE deve informar o participante sobre as respostas as pendências 4 e 5, acima, diferenciando os riscos inerentes aos procedimentos operatórios do tratamento padrão (exodontia e colocação

dos implantes) dos riscos inerentes aos procedimentos experimentais. RESPOSTA: Os principais riscos operatórios inerentes e potenciais aos procedimentos cirúrgicos incluem, mas não são limitados a eles, os seguintes:

- 1.Desconforto pós-operatório e edema que pode necessitar de alguns dias de recuperação
- 2.Sangramento continuado que pode ser prolongado
3. Infecção pós-operatória que pode exigir tratamento adicional.
- 4.Restrição da abertura bucal por alguns dias ou semanas.
- 5.Estiramento da abertura bucal por alguns dias ou semanas.
- 6.Fratura de mandíbula.
- 7.Injúria ao nervo subjacente aos dentes, resultando em adormecimento ou formigamento do lábio, queixo, bochechas, gengiva, dentes e/ou língua do lado operado, que pode persistir por semanas, meses ou, em raras circunstâncias, permanente.
- 8.Comunicação com o seio maxilar (uma cavidade normal localizada acima dos dentes superiores),exigindo cirurgia adicional.
- 9.Rejeição a materiais implantados (implantes, membranas, materiais sintéticos)
- 10.Deiscência de sutura expondo a área operada.
- 11.Não osseointegração dos implantes com a inutilização dos mesmos. Caso ocorra, estes implantes serão repostos, ficando o CEPID responsável por esta reposição, porém não haverá de maneira alguma devolução dos valores previamente combinados.
- 12.Necessidades de reintervenção cirúrgicas ou de um novo planejamento.
- 13.Os riscos inerentes aos procedimentos da coleta das amostras incluem apenas um aumento do desconforto pós-operatório, no momento da coleta 24 horas. Contudo o paciente já estará sob efeito de medicação analgésica.

ANÁLISE:PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Apesar dos riscos inerentes aos procedimentos operatórios (exodontia e colocação de implantes) terem sido elencados, estes foram relacionados utilizando-se termos técnicos, o que dificulta o entendimento de uma pessoa leiga. Salienta-se ainda que os riscos inerentes aos procedimentos experimentais não constam do TCLE. Não está clara neste documento a questão da anonimização das amostras antes delas serem enviadas aos Estados Unidos. RECURSO: Este item foi corrigido no TCLE:

“Antes de serem enviados à Universidade da Pennsylvania – EUA seus dados receberão um código com as iniciais do primeiro e último nome a fim de preservar sua identidade” “Os principais riscos da pesquisa incluem, mas não são limitados a eles, os seguintes: 1.Desconforto após a cirurgia e “inchaço” que pode necessitar de alguns dias de recuperação 2.Sangramento continuado que pode ser prolongado.

3.Contaminação após a cirurgia que pode exigir tratamento adicional.
4.Diminuição da abertura bucal por alguns dias ou semanas. 5.Pequeno corte no canto da boca por alguns dias ou semanas. 6.Fratura de mandíbula.

7.Trauma ao nervo próximo dos dentes, resultando em adormecimento ou formigamento do lábio, queixo, bochechas, gengiva, dentes e/ou língua do lado operado, que pode persistir por semanas, meses ou, em raras circunstâncias, permanente. 8.Comunicação com o seio maxilar (uma cavidade normal localizada acima dos dentes superiores), exigindo cirurgia adicional.

9.Rejeição a materiais (membranas, materiais sintéticos)

10.Afrouxamento da sutura “pontos” expondo a área operada.

11.Necessidades de outras cirurgias ou de um novo planejamento.

12.Os riscos dos procedimentos da coleta das amostras incluem apenas um aumento do desconforto após a cirurgia, no momento da coleta 24 horas. Contudo você já estará sob efeito de medicação analgésica.”

ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

7) Quanto a BIOBANCO e BIORREPOSITÓRIO, não há esclarecimento quanto ao destino do material coletado para as análises de expressão gênica, se as mesmas serão armazenadas ou descartadas após as análises de expressão dos genes sugeridos no protocolo (página 9 de 13), BMP-4, BMP-7, TGF-beta, PDGF e GAPDH. Solicita-se esclarecimento.

RESPOSTA:...O material coletado para análise da expressão dos GENES BMP-4, BMP-7, TGF-BETA, PDGF E GAPDH será descartado no final do experimento, ou seja, no final da análise.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

8) Os fitoquímicos a serem empregados são apresentados como produtos naturais. O Protocolo faz referência a alguns trabalhos de pesquisa onde os mesmos já estariam sendo pesquisados quanto a sua indicação como antiinflamatórios e/ou cicatrizantes. Ocorre que, diferente das tradicionais pesquisas com fármacos, não se apresentou uma brochura com relatos de pesquisas de avaliação de eficácia e segurança. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Seguem em anexo os artigos com as traduções.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Apenas um trabalho de cada produto proposto na metodologia foi inserido.

RECURSO: Embora apenas um artigo de cada fitoquímico tenha sido anexado, observou-se que estes compostos naturais afetam osso não só pela sua capacidade não enzimática de criar ligações cruzadas no

colágeno, mas também pela capacidade de alteração das respostas celulares como mudanças na disponibilidade de fatores de crescimento. E nenhum deles relatou qualquer interferência negativa ou prejudicial na saúde e nas respostas celulares. Resumindo, demonstraram-se como compostos seguros na utilização em humanos. ANÁLISE: RECURSO ATENDIDO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS no. 466 de 2012 e na Norma Operacional no. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASILIA, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:

Jorge Alves de Almeida Venancio (Coordenador)

Produção científica durante o doutorado

Capítulo de livro publicado:

Bianchini MA, Souza Júnior JM, Pereira Neto ARL, Melo EV, Cordero EB, Schuldt Filho G, Souza JGO, Claus JDP, Lucchiarri Junior N, Andrade PCAR, Passoni ROM. Tratamento não cirúrgico das alterações peri-implantares. In: Marco Aurélio Bianchini. (Org.). Diagnóstico e tratamento das alterações peri-implantares. 01ed. São Paulo: Santos, 2014, v. 01, p. 01-216.

Artigo completo publicado em periódico:

Souza Júnior JM; Souza JGO; Pereira Neto ARL; Iaculli F, Piattelli A, Bianchini MA. Analysis of Effectiveness of Different Rotational Instruments in Implantoplasty. Implant Dentistry (Print), v. 25, p. 1, 2016.

Alecio ABW, Souza Júnior JM, Dalago HR, Schuldt Filho G, Rodrigues MAP, Furtado JVM, Bianchini MA. As características protéticas das reabilitações implantossuportadas podem influenciar no sangramento a sondagem? Um estudo retrospectivo em 916 implantes.

ImplantNewsPerio International Journal, v. 1, p. 271-275, 2016.

Bianchini MA, Souza Júnior JM, Correa BB, Ouriques FD, Ilanes A. Implantes de corpo único com provisório imediato - relato de caso. Revista Catarinense de Implantodontia, v. 16, p. 14-17, 2016.

Bianchini MA, Souza Júnior JM, Ilanes A, Slovinski FV. Implantes de corpo único com diâmetros reduzidos. ImplantNewsPerio International Journal, v. 1, p. 857-866, 2016.

Correa BB, Souza Júnior JM, Passoni BB, Rafael CF, Bianchini MA. Implantoplastia no tratamento da peri-implantite - relato de caso. Full Dentistry in Science, v. 6, p. 492-499, 2015.

Prado AM, Pim LV, Souza Júnior JM, Souza JGO, Magini RS. Técnica do conjuntivo rotacionado palatino para fechamento de alvéolos pós-extração. Dental Press Implantology, v. 8, p. 31-38, 2014.

Souza Júnior JM, Passoni BB, Aecio ABW, Pereira MA, Ouriques FD, Bianchini MA. Prótese protocolo sobre implantes: complicações e soluções envolvendo cantilevers. Revista Catarinense de Implantodontia, v. 14, p. 18-22, 2014.

Pereira Neto ARL, Passoni BB, Souza Júnior JM, Souza JGO, Benfatti CAM, Magini RS, Bianchini MA. Creeping Attachment Involving Dental Implants: Two Case Reports with a Two-Year Follow-Up from an Ongoing Clinical Study. Case Reports in Dentistry, v. 2014, p. 1-6, 2014.

Souza JGO, Pereira Neto ARL, Schuldt Filho G, Dalago HR, Souza Júnior JM, Bianchini MA. Impact of local and systemic factors on additional peri-implant bone loss. Quintessence International, v. 14, p. 2013, 2013.

Resumos publicados em anais de congressos:

Montero JFD, Geremias TC, Pereira MA, Magini RS, Benfatti CAM, Souza Júnior JM, Schuldt Filho G, Bianchini MA. Avaliação da rugosidade da superfície de implantes após tratamentos para peri-implantite: estudo de caso. In: 33a Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research,

2016. v. 30. p. 573.

Souza Júnior JM, Jacob SMM, Dalago HR, Schuldt Filho G, Furtado JVM, De Bortoli NJ, Magini RS, Benfatti CAM, Cardoso AC, Bianchini MA. Angulated Abutments and Peri-implant Diseases. In: 7th IADR/PER Congress, 2014, Dubrovnik. Journal of Dental Research, 2014. v. 93.

Souza Junior JM, Souza JGO, Schuldt Filho G, Pereira Neto ARL, Dalago HR, Ouriques FD, Passoni BB, Alecio ABW, Prado AM, Benfatti CAM, Magini RS, Bianchini MA. Analysis of different rotational instruments in implantoplasty: sem effectiveness. In: 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, Seattle, WA. Journal of Dental Research, 2013.

Passoni BB, Schuldt Filho G, Souza JGO, Souza Júnior JM, Dalago HR, Alecio ABW, Ouriques FD, Prado AM, Cardoso AC, Magini RS, Benfatti CAM, Bianchini MA. Association between implant location and keratinized mucosa on bleeding status. In: 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, Seattle, WA. Journal of Dental Research, 2013.

Prado AM, Schuldt Filho G, Souza JGO, Dalago HR, Souza Júnior JM, Passoni BB, Alecio ABW, Bianchini MA, Volpato CA, Vasconcellos DK. Degree of satisfaction of patients treated with fixed implant dentures. In: 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, Seattle, WA. Journal of Dental Research, 2013.

Schuldt Filho G, Dalago HR, Souza JGO, Souza Júnior JM, Passoni BB, Alecio ABW, Ouriques FD, Prado AM, Bianchini MA. Influence of the local factors in periimplantitis? Prevalence. In: 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, Seattle, WA. Journal of Dental Research, 2013.