

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA CAROLINE LUPEPSA**

**AVALIAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A BAIXA  
DOSE DE ASPIRINA**

**Ponta Grossa – PR**

**2018**

**ANA CAROLINE LUPEPSA**

**AVALIAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A BAIXA  
DOSE DE ASPIRINA**

**Dissertação apresentada para obtenção  
de título de Mestre em Ciências da  
Saúde, na Universidade Estadual de  
Ponta Grossa, área de atenção  
interdisciplinar em saúde.**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre  
Franco**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti  
Gomes**

**Ponta Grossa – PR**

**2018**

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Lupepsa, Ana Caroline

L965      Avaliação da osseointegração em ratos submetidos a baixa dose de aspirina/ Ana Caroline Lupepsa. Ponta Grossa, 2018. 43f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes.

1.Ácido acetilsalicílico.  
2.Osseointegração. 3.Implantes. I.Franco, Gilson Cesar Nobre. II. Gomes, Ricardo Zanetti. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

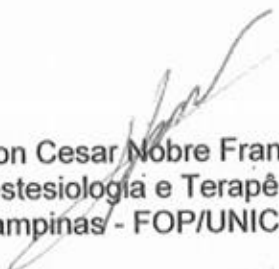
CDD: 616.092

**ANA CAROLINE LUPEPSA**

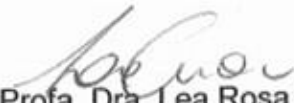
**AVALIAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A BAIXA  
DOSE DE ASPIRINA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Ciências da saúde - área de concentração em Atenção Interdisciplinar em Saúde.

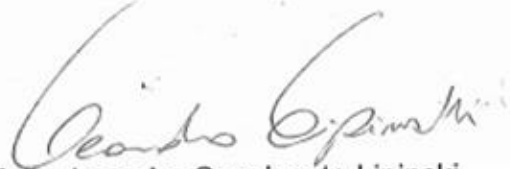
Ponta Grossa, 21 de maio de 2018.



Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco – Orientador  
Doutor em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica - Universidade Estadual de  
Campinas - FOP/UNICAMP



Profa. Dra. Lea Rosa Chioca Ferro  
Doutora em Farmacologia - Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski  
Doutor em Clínica Veterinária - Universidade de São Paulo - USP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sempre estar presente na minha vida e iluminar meu caminho tornando a realização desse sonho possível.

À minha família, em especial minha mãe Alice e meu pai Eugênio pelo incentivo e apoio dado durante esta trajetória, fazendo com que o caminho percorrido tenha se tornado mais fácil.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, o qual foi fundamental na minha formação. Agradeço toda a compreensão que teve nesses anos, os ensinamentos e experiências transmitidos e toda a confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes por toda a orientação dada.

À Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva, a qual foi de fundamental importância para que esse trabalho existisse, agradeço por toda a ajuda e disponibilidade no decorrer da pesquisa.

Ao meu namorado Roberto Nardi Silva Barbosa, pelo amor sem cobrança, pelo apoio e incentivo em cada passo dado, além de toda a paciência por ele concedida.

À Paula Katherine Vargas Sanchez, por toda ajuda e por confiar a mim essa pesquisa.

Ao Leomar Emanuel Almeida Mecca, por toda a ajuda, disposição e incentivo dado durante a pesquisa.

A empresa Neodent, por fornecer os implantes utilizados na pesquisa.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.  
(Madre Tereza de Calcutá)

## RESUMO

O atendimento odontológico em pacientes que fazem uso crônico de baixa dose de aspirina, para doenças cardiovasculares aumentou significativamente nos últimos anos. Este fármaco pertence à classe dos AINEs (anti-inflamatório não esteroidal) que por sua vez são descritos na literatura como agentes que podem interferir de forma negativa em processos biológicos relacionados, como o metabolismo e reparo ósseo, sendo assim o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do uso crônico de baixa dose de aspirina no processo de osseointegração de implantes de titânio utilizando modelo animal. Para isso, trinta e dois ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n = 8 / grupo), de acordo com a solução de gavagem oral recebida (42 dias) antes da cirurgia para a inserção do implante em tíbia (solução salina ou AAS, 6,75mg / kg). No período pós-operatório para realizar a análise histomorfométrica (7 ou 28 dias) do contato osso-implante (BIC) e ocupação da fração da área óssea (BAPT) os grupos foram divididos da seguinte forma: CG-7 soro fisiológico / 7 dias; CG-28 solução salina / 28 dias; AG-7 tratamento com baixa dose de AAS / 7 dias e AG-28 tratamento com baixa dose de AAS / 28 dias. Para analisar os dados foi utilizado ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey, sendo que o nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Os resultados indicaram que a porcentagem de contato osso-implante no grupo AG-7 foi significativamente reduzida em comparação com os grupos CG-7 e AG-28. Além disso, a análise BAPT mostrou uma diferença significativa na ocupação da fração da área óssea entre os grupos AG-7 e AG-28. Sendo assim os achados deste estudo demonstraram que o uso crônico de baixa dose de aspirina pode interferir negativamente nos estágios iniciais do processo biológico da osseointegração, reduzindo o contato osso-implante; no entanto os estágios finais, esse efeito parece não ser mais relevante, considerando os parâmetros BIC e BAPT.

**Palavras chave:** Ácido acetilsalicílico – Osseointegração – Implantes

## ABSTRACT

Dental care in patients who use chronic low-dose aspirin (LDA) for cardiovascular disease has increased significantly in recent years. This drug belongs to the class of NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs), which in turn are described in the literature as agents that may negatively interfere with related biological processes, such as metabolism and bone repair. To evaluate the effect of chronic use of low-dose of aspirin on the osseointegration process of titanium implants using an animal model. For this, thirty-two male Wistar rats were randomly divided into 4 groups (n=8/group) according to oral gavage solution received prior (42 days) to the implant surgery on tibia (saline solution or LDA, 6.75mg/kg) and the post-operative period to the histomorphometric analysis (7 or 28 days) of bone-to-implant contact (BIC) and bone area fraction occupancy (BAPT) as following: CG-7 - saline solution / 7 days; CG-28 - saline solution / 28 days; AG-7 - LDA treatment / 7 days and AG-28 - LDA treatment / 28 days. One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test was carried out to analyze the data with a significant level of 5%. BIC results indicate that the percentage of bone-to-implant on AG-7 group was significantly reduced compared to CG-7 and AG-28 groups. In addition, BAPT analysis showed a significant difference on the bone area fraction occupancy between AG-7 and AG-28 groups. The findings of this study demonstrated that the chronic use of LDA can negatively interfere on the early stages of osseointegration biological process, reducing the bone-to-implant contact; but on late stages, this effect seems not to be more relevant, considering BIC and BAPT parameters.

**Keywords:** Acetylsalicylic acid - Osseointegration - Implants



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema Biossíntese de prostanóides e leucotrienos a partir do ácido araquidônico.....	22
Figura 2: Divisão dos grupos conforme tratamento/período experimental. ....	25
Figura 3: Procedimento cirúrgico para instalação do implante. Em A observamos a incisão realizada na metáfise tibial, em B o momento da perfuração óssea e em C a instalação do implante.....	26
Figura 4: Inclusão em Resina de polimetilmetacrilato LR White (London ResinCompany, Berkshire, Inglaterra). ....	28
Figura 5: Análise BIC. . ....	29
Figura 6: Análise BABT. ....	29
Figura 7: Desenho experimental.....	30
Gráfico 1: Análise contato osso-implante (BIC) .....	31
Gráfico 2: Análise da fração da área ocupada pelo osso (BABT) .....	32
Figura 8: Lâminas da análise histológica. Comparação entre os grupos CG-7, AG-7, CG-28 e AG-28. Em (A e B), aumento de 100 µm e 50 µm respectivamente, observa-se redução do contato osso-implante nos animais em tratamento com aspirina (AG-7) e em (C e D), grupo controle, observa-se o implante osseointegrado. Em (E e G) observa-se um crescimento ósseo semelhante em toda a superfície do implante.....	33

## LISTA DE SIGLAS

- AAS - Ácido acetilsalicílico
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroidas
- BABT - Bone area between threads (fração de área ocupada pelo osso)
- BIC - Bone-implant contact (Contato osso-implante)
- BMP-2 - Proteína morfogênica do osso 2
- BSA - Área de superfície corporal
- Cbfa1 - Core binding factor alpha 1
- COX – Ciclooxigenase
- DCV - Doenças cardiovasculares
- DV - Desvio padrão
- FDA - Food and Drug Administration
- FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
- FWW - Fator de von Willebrand
- IC50 - Concentração necessária para inibir 50% da atividade da COX
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-6 - Interleucina-6
- IL-11 - Interleucina-11
- LOX - Lipooxigenase
- MIP-1- Proteína Inflamatória de Macrófagos
- MMP - Metaloproteinase de matriz
- PGs – Prostaglandinas
- PGHS - aPGs G/H síntase
- PGE<sub>1</sub> - Prostaglandina E<sub>1</sub>
- PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PMN – Polimorfonucleares
- RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$
- TXA<sub>2</sub> – Tromboxano A<sub>2</sub>
- TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformante beta
- TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa
- VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

$\beta$  - Beta

$\alpha$  - Alfa

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

$>$  - Maior que

$<$  - Menor que

$\geq$  - Maior ou igual

$\leq$  - Menor ou igual

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
IMPLANTES NA ODONTOLOGIA .....	12
OSSEOINTEGRAÇÃO:.....	
.....	13
MEDIADORES DA OSSEOINTEGRAÇÃO .....	15
ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS E O METABOLISMO ÓSSEO.....	18
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
GERAL: .....	23
ESPECÍFICOS:.....	23
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
CONSIDERAÇÕES SOBRE ANIMAIS, ÉTICA E PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO.....	24
PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	25
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES:.....	26
OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS (BIC/BABT)	27
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>43</b>

## INTRODUÇÃO

Embora os primeiros estudos com a utilização de implante dentário tenham sido realizados na década de 60, desde meados dos anos 600 d.C seu uso já havia sido relatado, tornando-se, atualmente, uma prática cada vez mais comum (Gaviria et al., 2014 <sup>[1]</sup>, Abraham M, C, 2014 <sup>[2]</sup>). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios (ABIMO), no Brasil são inseridos aproximadamente 2,5 milhões de implantes por ano, sendo considerada uma boa opção para reabilitação oral, devolvendo a funcionalidade e estética ao paciente (ABIMO <sup>[3]</sup>).

No entanto, para obtenção do sucesso clínico, é necessário um correto processo de osseointegração, o qual segundo Branemark é caracterizado pela conexão estrutural e funcional entre osso e a superfície do implante submetido à carga funcional (Mavrogenis et al., 2009<sup>[4]</sup>; Brånemark PI, 1983 <sup>[5]</sup>). Dentro desse processo, vários mediadores atuam em equilíbrio para que ocorra a formação óssea (Terheiden L, 2014<sup>[6]</sup>).

Em meio às substâncias envolvidas, destacam-se as prostaglandinas (PGs), derivadas da enzima Ciclooxigenase (COX), a qual apresenta diferentes isoformas, sendo a COX-1 e COX-2 as mais conhecidas e estudadas. A COX-1, dita constitutiva, é expressa em condições fisiológicas e está presente nas plaquetas, onde tem a função de produzir tromboxano (TXA<sub>2</sub>), o qual é fundamental para a agregação plaquetária, além de também estar presente no trato gastrointestinal, onde tem papel importante na formação de muco para a proteção gástrica. Por sua vez, a COX-2, considerada induzida, é expressa na presença de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1, interleucina-2 e fator de necrose tumoral), fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos (Carvalho et al., 2004<sup>[7]</sup>; Mendes et al., 2012 <sup>[8]</sup>).

Apesar disso, sabe-se atualmente que a COX-2 também é encontrada constitutivamente em alguns tecidos, na formação de prostanóides relacionados com a homeostase de diferentes órgãos e sistemas, incluindo o metabolismo ósseo (Akyazi et al., 2013<sup>[9]</sup>, Barudzic et al., 2013<sup>[10]</sup>, Murtaza et al., 2014<sup>[11]</sup>, Kovacs et al 2014., <sup>[12]</sup>).

Estudos alegam que as PGs formadas pela ação de COX-2 são fundamentais para uma correta expressão da proteína morfogênica do osso 2 (BMP-2), a qual

representa uma importante enzima osteogênica, criando assim uma base biológica para a relação entre COX e o metabolismo ósseo (Chikazu et al., 2007<sup>[13]</sup>, Chikazu et al., 2002<sup>[14]</sup>). Neste sentido, tendo em vista a importância biológica da COX no processo de formação óssea, o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) é apresentado na literatura como um possível agente modificador (de forma negativa) do processo de osseointegração, pois seu mecanismo de ação consiste em inibir a enzima COX e, conseqüentemente impede que PGs sejam formadas (Kalyvas G, D; Tarenidou M, 2008<sup>[15]</sup>).

Dentre os AINES, o ácido acetilsalicílico (AAS) é o medicamento mais antigo e estudado, sendo aproximadamente 166 vezes mais potente como inibidor da COX-1 do que da COX-2 (Gum et al., 2001<sup>[16]</sup>; Batlouni, M 2010<sup>[17]</sup>). Este apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antitérmicas, além de apresentar propriedade anticoagulante quando utilizado em baixas doses (75 – 325 mg/dia) e por um tempo prolongado, sendo útil na prevenção primária e, principalmente, secundária de doenças cardiovasculares (DCV) (Xu et al., 2014<sup>[18]</sup>). Em decorrência desta importante indicação clínica, cada dia é mais comum o atendimento odontológico de pacientes em uso crônico de baixa dose de ácido acetilsalicílico. Porém, não existem relatos na literatura da influência desta medicação no processo de osseointegração quando administrada de forma prolongada em doses menores.

Considerando o crescente número de pacientes usuários desta terapia, que buscam na implantodontia a reabilitação bucal, é necessário estabelecer quais são os possíveis fatores que podem interferir no processo de osseointegração (Arizmendi et al., 2000<sup>[19]</sup>; Lemuz Cruz et al., 2009<sup>[20]</sup>).

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **IMPLANTES NA ODONTOLOGIA**

Uma das grandes preocupações da Odontologia é devolver a funcionalidade e estética ao paciente. Neste sentido, a utilização de implantes dentários pode ser considerada uma boa alternativa para esta reabilitação oral proposta. Os implantes, confeccionados em metal (ex. titânio), cerâmica ou polímero, apresentam importantes propriedades biológicas e mecânicas, tais como a biocompatibilidade,

que irá permitir uma resposta de cicatrização celular e tecidual local (Arizmendi et al., 2000 <sup>[19]</sup>, Lemus Cruz et al., 2009 <sup>[20]</sup>).

Dados recentes demonstram que nos Estados Unidos a perda de um dente permanente decorrente de um acidente ou até mesmo de doenças periodontal, ocorre em 69% dos adultos com idade entre 35 a 44 anos e que, aproximadamente 26% dos adultos com 74 anos perdem todos os dentes permanentes (Gaviria et al., 2014 <sup>[1]</sup>, Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais <sup>[21]</sup>).

Após anos de estudos, Branemark, em 1952, promoveu a maior descoberta na área da implantodontia. Estudando o fluxo de sangue em fêmur de coelho, observou que, ao colocar câmaras de titânio no osso, elas se tornavam solidamente fixas e não poderiam mais ser removidas, ficando o osso efetivamente ligado à superfície de titânio. Ainda, em 1965, Branemark inseriu pela primeira vez o implante de titânio em um paciente e, após um período de seis meses, observou-se que este estava completamente integrado, ficando esse fenômeno conhecido como osseointegração (Gaviria et al., 2014 <sup>[1]</sup>, Abraham M, C, 2014 <sup>[2]</sup>, Branemark et al., 1985 <sup>[22]</sup>).

## OSSEOINTEGRAÇÃO

O sucesso clínico de um implante se deve a um correto processo de osseointegração, o qual é responsável por gerar o contato direto entre implante e tecido ósseo (Mavrogenis et al., 2009 <sup>[4]</sup>), sendo o mesmo dividido didaticamente em quatro fases: hemostasia; inflamatória; proliferativa e remodelação.

A primeira fase, denominada de hemostasia, inicia-se quando a broca perfura o osso e causa danos ao mesmo. Nesse momento, ocorre um extravasamento de células sanguíneas de dentro dos vasos, o que promove o contato da superfície do implante com íons, H<sub>2</sub>O e proteínas plasmáticas, como albumina e fibronectina (Mavrogenis et al., 2009 <sup>[4]</sup>, Terheyden et al., 2012 <sup>[23]</sup>). Ainda, no local da lesão, a vasoconstrição é desencadeada, reduzindo o fluxo de sangue local, tornando preferencial o fluxo pelos ramos colaterais dilatados (Terheyden et al., 2012 <sup>[23]</sup>).

Durante esse processo, as células sanguíneas entram em contato com o colágeno da região subendotelial, tornando as plaquetas ativadas, que, por sua vez, irão se agregar umas as outras para formar o tampão mecânico durante a resposta hemostática normal (Mackie et al., 1985 <sup>[24]</sup>, Hoffbrand et al., 2013 <sup>[25]</sup>). Essa ação é

dividida em adesão, agregação e ativação plaquetária, a qual tem como consequência a liberação do conteúdo granular. As plaquetas sofrem mudanças morfológicas e bioquímicas como uma resposta para a superfície externa lesionada (Mavrogenis et al, 2009 <sup>[4]</sup>). Após esta mudança, elas se aderem ao local onde há o vazamento celular, porém, como a ligação é muito fraca, necessita que seja estabilizada. A ativação da cascata da coagulação estabiliza o coágulo de fibrina e bloqueia o sangramento (Mountziaris et al., 2008 <sup>[26]</sup>).

A segunda fase, denominada de inflamatória, inicia-se logo após a degranulação das plaquetas. Entre os componentes dos grânulos, encontram-se os fatores de crescimento de plaquetas, fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Além disso, há a ativação de polimorfonucleares (PMN) e macrófagos que chegam até o local da lesão por diapedese. Nesse contexto, a bradicinina aumenta a permeabilidade vascular permitindo que as células migrem para o local lesionado por meio de movimentos ameboides entre os espaços intercelulares (Mavrogenis et al., 2009 <sup>[4]</sup>; Mountziaris et al., 2008 <sup>[26]</sup>).

Com relação à função neutrofílica, os PMN acabam por eliminar qualquer elemento ou bactéria que possa gerar infecção por meio da liberação de radicais reativos de oxigênio e também pela liberação de enzimas digestivas (colagenase e elastase). Os macrófagos, por sua vez, sintetizam citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por seus efeitos destrutivos sobre o tecido ósseo; além de fagocitarem bactérias. Moléculas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1) também são importantes nessa fase, pois se difundem facilmente através da matriz extracelular e, portanto, são ideais para a transmissão de sinais de orientação de regeneração (Mountziaris et al., 2008 <sup>[26]</sup>). Outro mediador químico é a histamina, que é responsável por aumentar o fluxo sanguíneo e reduzir a velocidade da corrente sanguínea, proporcionando, dessa maneira, hiperemia no local. A partir desse momento, a vasoconstrição inicial na fase hemostática é então transformada em vasodilatação (Terheyden et al., 2012 <sup>[23]</sup>).

Os macrófagos são as principais células no final da inflamação, pois secretam, além das citocinas, moléculas mensageiras como PDGF, FGF, Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP-1), IL-6, Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e recrutam também os fibroblastos para promover a angiogênese ((Terheyden et al., 2012 <sup>[23]</sup>; Mountziaris et al., 2008 <sup>[26]</sup>).



Os fibroblastos se fixam na superfície do implante por meio dos sítios de ligação da integrina, sendo este considerado o início da terceira fase, chamada de proliferativa, que ocorre dias após o procedimento cirúrgico. Ela começa com o processo de angiogênese fornecendo oxigênio ao tecido e favorecendo o processo de reparo dos vasos e, após, ocorre a ativação dos osteoclastos que são células grandes multinucleadas e tem a função de degradar tecido ósseo mediante enzimas proteolíticas e um pH ácido. Este processo promove à dissolução de osso liberando ácido clorídrico e proteases que estimulam as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), às quais ajudam a diferenciação dos osteoblastos, responsáveis pela formação óssea ao redor da superfície do implante, gerando uma estabilidade secundária (Terheyden et al., 2012<sup>[23]</sup>).

A quarta e última etapa é caracterizada pela remodelação, semanas após o procedimento cirúrgico. Inicia-se quando o implante dentário recebe carga e a organização do osso torna-se trabecular. Nesta etapa, o osteoclasto e o osteoblasto trabalham juntos até quando o osteoclasto é desativado pelo RANK (Receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$ ) e o osteoblasto começa a formação de osso lamelar com a coordenação dos osteócitos, os quais são células reguladoras do processo de remodelação. Depois de formado o osso lamelar, este absorve a carga como um estímulo e forma o osso trabeculado perfeitamente osseointegrado ao implante (Terheyden et al., 2012<sup>[23]</sup>).

## MEDIADORES DA OSSEOINTEGRAÇÃO

O tecido osseo é continuamente renovado por diversos estímulos que compõem a remodelação óssea (Boyce B, F; Xing L, 2008<sup>[27]</sup>, Yao et al., 2008<sup>[28]</sup>; Murillo et al., 2010<sup>[29]</sup>). Citocinas inflamatórias, hormônios e fatores de crescimento controlam esse processo, sendo que, qualquer alteração pode levar a um desequilíbrio entre as atividades de osteoclastos e osteoblastos, interferindo assim na osseointegração (Murillo et al., 2010<sup>[29]</sup>)

Atualmente, sabe-se que as citocinas inflamatórias desempenham ação importante na osseointegração, em especial a interleucina (IL) -1, -6 e -11. As IL-1 e IL-6 são responsáveis por estimular a reabsorção ossea, pois aumentam a proliferação e diferenciação de osteoclastos (Aragão et al., 2011<sup>[30]</sup>; Aragão V, D, N, 2002<sup>[31]</sup>). Ainda, acredita-se que a IL-6, juntamente com a IL-11 desempenham importante papel nas fases iniciais da osteoclastogênese (Gil et al., 2006<sup>[32]</sup>). Além

das citocinas inflamatórias, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), produzido principalmente por monócitos e macrófagos nas fases iniciais da inflamação, também atua regulando a diferenciação e função de osteoblastos e osteoclastos por meio de dois receptores de superfície celular (Mountziaris et al., 2008 <sup>[26]</sup>; Aragão V, D, N, 2002 <sup>[31]</sup>)

Durante o processo de inflamação, substâncias com importante função na osseointegração são sintetizadas mediante ação da enzima ciclooxigenase (COX). Atualmente sabe-se que há duas isoformas da enzima, COX-1 e COX-2. A COX-1 é dita constitutiva e está presente na maioria dos tecidos, sendo responsável por manter a homeostasia. Já a COX-2 é expressa quando se inicia a inflamação, sintetizando prostaglandinas (PGs) (Raisz L, G, 1999 <sup>[33]</sup>; Zhang et al., 2002 <sup>[34]</sup>). Devido ao fato da COX-2 sintetizar a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), responsável pela formação óssea, acredita-se que a mesma tenha papel fundamental na osseointegração. Além disso, estudo demonstrou que a expressão de COX-2, mas não de COX-1, foi elevada durante os primeiros 14 dias após a lesão óssea, sugerindo que seu aumento transitório pode desempenhar um papel importante nas fases iniciais do reparo ósseo (Gerstenfeld et al., 2003 <sup>[35]</sup>). Diante disso, não há dúvida de que o processo inflamatório desempenha um papel importante no reparo ósseo (Aragão et al, 2011 <sup>[30]</sup>).

A COX-2 também pode exercer sua função por meio da regulação de fatores de transcrição, Cbfa1 (core binding factor alpha 1) e osterix. Além disso, esses fatores de transcrição exercem um papel independente, pois Cbfa1 está envolvido na regulação de vários genes específicos de osteoblastos, incluindo osteocalcina (Zhang et al., 2002 <sup>[34]</sup>; Ducy et al., 1997 <sup>[36]</sup>), e osterix é responsável pela diferenciação de células mesenquimais (Nakashima et al., 2002 <sup>[37]</sup>; Zhang et al., 2002 <sup>[34]</sup>). Em concordância com tais elucidações, estudos relatam que Cbfa-1 e Osterix são fatores importantes para a produção de osteoblastos, pois camundongos nocautes apresentavam deficiência na sua produção (Nakashima et al., 2002 <sup>[37]</sup>; Ribeiro et al., 2007 <sup>[38]</sup>). Sendo assim, a diminuição da expressão desses genes pode interferir de maneira negativa no reparo ósseo (Zhang et al., 2002 <sup>[34]</sup>).

Além desses mediadores, estudos sugerem que um correto processo de osseointegração requer a ação de fatores de crescimento como, por exemplo, fator transformador beta (TGF-β), pertencente a uma família de proteínas abundantes no tecido ósseo, as quais ficam latentes na matriz óssea, sendo ativadas durante a

reabsorção realizada pelos osteoclastos. Apresentam como função estimular a formação óssea, potencializando a diferenciação dos osteoblastos, além de inibir a síntese de proteases, como a metaloproteínase de matriz (MMP). Outro mediador importante na diferenciação dos osteoblastos é o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Corroborando com tais elucidicações, foi demonstrado, em estudo clínico, que FGF pode ser um estimulador da regeneração óssea, visto que aumentou a altura do osso alveolar em pacientes com periodontite (Murillo et al., 2010 <sup>[31]</sup>). Há relatos na literatura de que FGF também atua como mitogênico de células endoteliais vasculares, o que é importante para oxigenar o tecido osseo (Gil et al., 2006 <sup>[32]</sup>; Marie P J, 2003 <sup>[39]</sup>).

Além do FGF, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também tem papel importante na oxigenação do tecido, pois induz a angiogênese e a proliferação endotelial vascular, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade. Atualmente, está sendo considerado como um dos fatores chave no desenvolvimento dos estágios iniciais de reparo de fratura e regeneração óssea. Qualquer influência sobre este fator de crescimento pode prejudicar a angiogênese durante a reparação óssea (Gil et al., 2006 <sup>[32]</sup>; Kalyvas G, D; Tarenido M, 2008 <sup>[15]</sup>).

Ainda na fase de oxigenação outro mediador importante é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que contribui para a neovascularização e síntese de colágeno, favorecendo a cicatrização, além de desempenhar um papel indireto na osteogênese (Hofbauer et al., 1999 <sup>[40]</sup>; Chaudhary L, R e Hruska K, 2001<sup>[41]</sup>; Chang et al., 2010 <sup>[42]</sup>). Como descrito anteriormente, muitas substâncias estão envolvidas na osteogênese, sendo que ao final desse processo é necessário a transformação do tecido conjuntivo em tecido ósseo e essa função é desenvolvida pelas proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), presentes em grandes quantidades no tecido ósseo, as quais são consideradas os fatores mais potentes da diferenciação osteoblástica (Yamaguchi et al., 2000<sup>[43]</sup>).

Nesse sentido, alguns autores têm demonstrado que a regeneração do osso é reforçada pela aplicação de BMP-2 e essa ação pode aumentar quando usado sinergicamente com FGF e IGF-1, além do fato de que a combinação de BMP-2 e FGF mostrou um rápido crescimento do osso (Park et al., 2007 <sup>[44]</sup>; Lan et al., 2006 <sup>[45]</sup>; Mavrogenis et al., 2009 <sup>[4]</sup>). Estudos sugerem ainda que BMP-2 induz a expressão de COX-2 em osteoblastos, o que contribui para a sua diferenciação e,

consequentemente, induz a remodelação ossea. Sendo assim, o BMP-2 é um importante fator local que promove a formação óssea (Chikazu et al., 2007 <sup>[13]</sup>).

## ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS E O METABOLISMO ÓSSEO

Assim como o ácido acetilsalicílico, os outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) também inibem a enzima cicloxigenase aliviando a dor e inflamação. No entanto, a inibição da COX-1 pode causar complicações gastrointestinais como úlcera, perfuração e hemorragia devido ao fato das PGs provenientes dessa isoforma serem fundamentais na proteção da mucosa gástrica contra a ação corrosiva do ácido clorídrico (Batlouni M, 2010 <sup>[17]</sup>). Diante disso, a indústria farmacêutica mobilizou-se no lançamento de AINES seletivos para COX-2 que tinham como propósito reduzir o processo inflamatório sem causar toxicidade gastrointestinal (Mendes et al., 2012<sup>[8]</sup>; Franco et al., 2006 <sup>[46]</sup>). Os primeiros representantes dessa classe de medicamentos foram o celecoxibe e rofecoxibe, já a segunda geração incluiu valdecoxibe, etoricoxibe e parecoxibe. No entanto, a inibição seletiva da COX-2 causa um desequilíbrio entre a produção de prostaciclina endoteliais e TXA<sub>2</sub>, o que aumenta o risco de trombose e eventos vasculares (Franco et al., 2006 <sup>[46]</sup>).

Nos dias atuais, há uma grande variedade de AINES no mercado, diferindo basicamente em seu grau de seletividade sobre as isoformas da ciclooxigenase. Essa seletividade dos AINES é expressa em termos de IC<sub>50</sub> (Concentração necessária para inibir 50% da atividade da COX), sendo que uma alta relação COX1/COX2 significa que é um fármaco mais seletivo para COX-2 (Franco et al., 2006 <sup>[46]</sup>).

Há estudos experimentais sobre os possíveis efeitos dos AINES quando utilizados em pacientes com implantes orais. (Kalyvas G, D; Tarenidou M, 2008 <sup>[15]</sup>), como é o caso da pesquisa realizada por Chikazu e colaboradores, em 2007 <sup>[13]</sup>, que avaliaram o efeito da COX-2 em ratos submetidos a implante de titânio. No estudo foram utilizados dois grupos, um com a expressão da COX-2 (COX-2+/+) e outro grupo nocaute para COX-2 (COX-2/-). Os autores relataram que a expressão de osteocalcina foi mais significativa nos animais COX-2+/+ e a formação óssea ao redor do implante foi mínima no grupo COX-2/-, sugerindo que a COX-2 tem um papel essencial na osseointegração e a sua inibição pode interferir de maneira negativa nesse processo.

Nesse contexto, uma pesquisa realizada para avaliar a reparação óssea em ratos nocautes para COX-1 e COX-2 demonstrou que apenas a COX-2 é importante para a formação óssea endocondral e intramembranosa durante a reparação óssea, enquanto que a COX-1 não tem função primordial nesse processo. Além do que o grupo com expressão da COX-2 teve uma formação óssea endocondral e junção das fraturas mais acentuada comparada com o grupo COX-2<sup>-/-</sup> (Zhang et al., 2002<sup>[34]</sup>). Além da ação da COX na reparação óssea, a mesma pesquisa avaliou a ação de fatores de crescimento como PGE2 e BMP-2, onde constatou que a adição de PGE2 em culturas COX-2<sup>-/-</sup> restaura a formação de nódulos para níveis iguais ao das culturas com expressão da COX-2, o que sugere que BMP-2 e PGE2 suprime a deficiência em COX-2 e aumenta a formação de nódulos de osso para um grau semelhante ao que é observada em culturas COX-2<sup>+/+</sup>. Também foi relatado no estudo que PGE2 e BMP-2 adicionados juntos aumentavam a formação óssea em comparação de quando eram adicionados isoladamente (Zhang et al., 2002<sup>[34]</sup>).

Outra evidência do efeito deletério dos AINEs na osseointegração foi relatada em um estudo com cetorolaco, um inibidor não seletivo de COX, e rofecoxibe, inibidor seletivo para COX-2, na reparação de fratura óssea. Foi constatado que a COX-2 se eleva durante os primeiros 14 dias após a fratura, o que demonstra sua importância nas fases iniciais da osseointegração (Gerstenfeld et al., 2003<sup>[35]</sup>). Ainda, corroborando com tais elucidaciones, em um estudo *in vitro*, foi observado que a indometacina e cetorolaco diminuíram a proliferação de osteoblastos primários, sendo o efeito dependente da dose e do tempo, o que evidencia que a ação negativa dos AINES se restringe às fases iniciais (Ho et al., 1999<sup>[47]</sup>).

Em concordância, Goodman e colaboradores, em 2002<sup>[48]</sup>, estudando o efeito de AINES seletivos e não seletivos no crescimento ósseo e diferenciação de tecidos, constatou que o crescimento ósseo foi retardado depois de 4 semanas usando AINES não seletivo e seletivo, além disso, também foi observado uma diminuição de osteoclastos, o que segundo os autores, está relacionada com a inibição da IL-6, a qual é crucial para a diferenciação e maturação de osteoclastos.

Por meio destes estudos, fica demonstrado que a produção de metabólitos de COX-2 durante a fase inflamatória é necessária para a eficiente regeneração do osso e que a diferenciação das células mesenquimais é um dos principais alvos da atividade da COX. Entretanto, algumas pesquisas realizadas em modelo animal, relatam que não há efeito deletério dos AINES na

remodelação ossea, como é o caso do flurbiprofeno (inibidor não seletivo de COX), que não interferiu no processo de osseointegração, visto que não houve diferença estatística entre o grupo que usou o medicamento e o que não utilizou (Jeffcoat et al., 1995 <sup>[49]</sup>; Kalyvas G, D; Tarenidou M, 2008 <sup>[15]</sup>).

Essa discrepância nos resultados encontrados pode estar relacionada com as limitações dos estudos como, por exemplo, a utilização de um implante em miniatura que pode ter um processo de cicatrização diferente do que é comumente utilizado, com um diâmetro grande e áspero, além da maioria dos estudos não colocar carga. Ainda, a dose dos medicamentos utilizada nos estudos geralmente não condiz com a dose utilizada na prática clínica, além do metabolismo farmacológico ser diferente em animais e humanos (Fu et al., 2012 <sup>[50]</sup>).

Portanto, é possível que alterações sistêmicas e locais na produção de prostaglandinas por COX-1 e COX-2 possam conduzir a diferentes respostas biológicas, o que poderia afetar o reparo do tecido local (Gerstenfeld et al., 2003 <sup>[35]</sup>). Nesse sentido é necessário que o papel das prostaglandinas e os efeitos da inibição da COX sejam definidos para compreender as variações que são produzidos pelos AINES na remodelação dada a sua vasta utilização clínica. (Chikazu et al., 2007 <sup>[13]</sup>; Gerstenfeld et al., 2003 <sup>[35]</sup>).

## ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

O ácido acetilsalicílico é um fármaco antigo e muito usado no mundo, com um número variado de ações farmacológicas. Foi sintetizado há milhares de anos a partir da decocção de plantas que continham salicilato, o qual tinha como característica sabor amargo e coloração branca (Kenneth K, W, 2003 <sup>[51]</sup>; Vane J, R; Botting R, M, 2003 <sup>[52]</sup>; Vane J, R, 1971 <sup>[53]</sup>). Há relatos da utilização dos salicilatos desde o tempo de Hipócrates, mas somente em 1874 foi usado na redução da dor e inflamação e, em 1895, Hoffman, por meio da acetilação do grupo hidroxila do anel benzênico, descobriu o ácido acetilsalicílico, o qual se constatou ter menos efeitos colaterais (Vane J, R; Botting R, M, 2003 <sup>[52]</sup>; Moreira et al., 2008 <sup>[54]</sup>).

Apesar das grandes descobertas sobre o fármaco, pouco se sabia sobre o seu mecanismo de ação. Foi então que Piper P, J; Vane J, R, 1969 <sup>[55]</sup>, ao pesquisarem a reação anafilática, descobriram as PGs e o tromboxano A2 (TXA2). Mais tarde foi constatado que as PGs eram inibidas após uma hora da administração

do fármaco, o que comprovou que a ação do ácido acetilsalicílico não se restringia a um único tecido (Vane J, R; Botting R, M 2003 <sup>[52]</sup>; Smith J, B; Willis A, L, 1971 <sup>[56]</sup>)

Em 1971 já havia relatos de que a PGE<sub>1</sub> era um potente agente antipirético e que, PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub> desencadeavam uma resposta inflamatória quando injetadas por via intradérmica, além de grandes evidências de que as PGs estavam envolvidas no processo de inflamação e que o ácido acetilsalicílico tinha a capacidade de bloquear sua biossíntese (Vane J, R; Botting R, M, 2003 <sup>[52]</sup>). A partir de então o foco das pesquisas passou a ser as PGs, sendo que em 1976 foi isolada a PGs G/H síntase (PGHS), genericamente chamada de COX, a qual é a principal enzima responsável por catalisar a síntese de prostanóides (Vane J, R; Botting R, M, 2003 <sup>[52]</sup>; Hemler et al., 1976 <sup>[57]</sup>; Smith et al., 2002 <sup>[58]</sup>, Chikazu et al., 2007 <sup>[13]</sup>).

Atualmente, sabe-se que as PGs são produtos de ácidos graxos livres provenientes do ácido araquidônico, o qual está presente na bicamada de fosfolípidios da membrana na forma de araquidonato e é o responsável pela estrutura básica das PGs. Vários estímulos ativam fosfolipase A2, que hidrolisa os fosfolípidios da membrana, liberando assim, o ácido araquidônico, que servirá de substrato para duas vias distintas, a da ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX) (Miller S, B, 2006 <sup>[59]</sup>; Vane J, R, 1971 <sup>[53]</sup>; Marnett et al., 1999 <sup>[60]</sup>; Patrono et al., 2009 <sup>[61]</sup>; Kummer C, L; Coelho T, C, 2002 <sup>[62]</sup>; Smith et al., 2002 <sup>[56]</sup>).

Na via LOX o ácido araquidônico é convertido em leucotrienos (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>) e lipoxinas, que promovem resposta inflamatória e desencadeiam manifestações alérgicas (Batlouni M, 2010 <sup>[17]</sup>; Ruiz et al., 2015 <sup>[63]</sup>). Já na via da COX, ocorre oxigenação do ácido araquidônico, obtendo o endoperóxido de PG G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) que, em seguida, é reduzido a PGH<sub>2</sub>, responsável pela formação das diferentes formas de PGs (PGD, PGE, PGF, PGI) e TXA<sub>2</sub> (Patrono et al., 2009 <sup>[61]</sup>; Kirkby et al., 2013 <sup>[64]</sup>; Kummer C, L; Coelho T, C, 2002 <sup>[62]</sup>; Patrignani P; Patrono C, 2015 <sup>[65]</sup>).

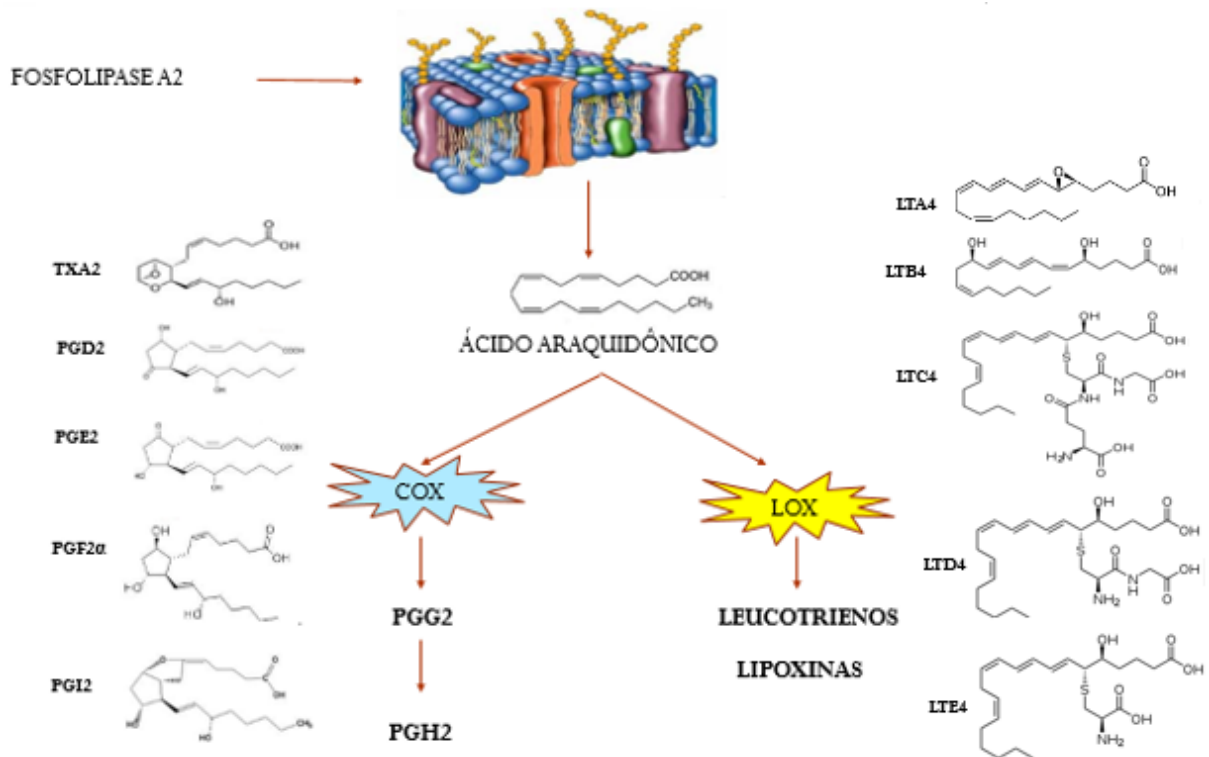


Figura 1: Esquema Biossíntese de prostanóides e leucotrienos a partir do ácido araquidônico (Fonte: O autor).

As PGs exercem seus efeitos por meio de receptores ligados a proteína G, sendo que a ativação dos mesmos estimula sistemas efetores responsáveis pela liberação de um segundo mensageiro em diversos tecidos, estando organizados em cinco grupos, de acordo com a afinidade. Devido a grande diversidade de receptores, pode-se explicar a variedade de efeitos que as PGs exercem no organismo, como: inflamação, coagulação sanguínea, função renal, tônus vascular, resposta imune etc. (Alencar A, M, M, et al., 2005<sup>[66]</sup>, Carvalho A, W, et al., 2004<sup>[7]</sup>).

Conforme visto anteriormente há duas isoformas bem elucidadas da enzima COX. A COX-1, chamada de constitutiva ou fisiológica, é expressa na maioria dos tecidos e está envolvida em processos fisiológicos, como na agregação plaquetária e citoproteção gástrica, pois mantêm uma taxa basal de biossíntese de prostanóides no corpo (Kummer C, L; Coelho T, C, 2002<sup>[62]</sup>; Kirkby et al., 2013<sup>[64]</sup>; Hilário et al., 2006<sup>[67]</sup>). A COX-2 é dita patológica e está envolvida preferencialmente em processos inflamatórios e de dor, sendo sua expressão aumentada consideravelmente na presença de diferentes estímulos lesivos, além de estar também relacionada com a homeostasia de vários órgãos e sistemas, incluindo o



tecido ósseo, apresentando dessa forma papel fundamental no processo de remodelação óssea (Akyazi et al., 2013<sup>[9]</sup>; Kalyvas G, D; Tarenidou, M, 2008<sup>[15]</sup>).

O ácido acetilsalicílico inibe ambas as isoformas de COX, e seu mecanismo consiste na acetilação irreversível do grupamento hidroxila do resíduo ativo da enzima ciclooxigenase, a serina 530, e assim, conseqüentemente, acaba por bloquear a síntese de PGs (Vane J, R; Botting R, M 2003<sup>[52]</sup>; Gacion Z, 2003<sup>[68]</sup>). Nesse sentido foi proposto que, além de anti-inflamatório o fármaco também tem ação de antiagregante plaquetário, visto que ao inibir irreversivelmente a ciclooxigenase, o fármaco bloqueia a formação de TXA2, o qual é derivado de PGH2 e é responsável por ativar a agregação plaquetaria, devido sua ação vasoconstritora. (Ruiz et al., 2015<sup>[63]</sup>; Oliveira M, M, G, 2001<sup>[69]</sup>).

Aproximadamente 40 mg de ácido acetilsalicílico por dia é suficiente para inibir a síntese de TXA2 (Ruiz et al., 2015<sup>[63]</sup>). Além disso, devido à inativação irreversível da COX, o efeito do fármaco persiste pelo tempo de vida das plaquetas, que é de aproximadamente 10 dias. Após a ingestão, o início de ação ocorre de 20 a 30 minutos, sendo que seu pico de ação pode variar de uma a três horas e sua meia vida plasmática é de 15 a 20 minutos (Oliveira M, M, G, 2001<sup>[69]</sup>; Couto, A, A, 1998<sup>[70]</sup>).

## **OBJETIVOS**

### **GERAL:**

Avaliar o efeito do uso prolongado de baixa dose de ácido acetilsalicílico no processo de osseointegração de implantes de titânio em modelo animal.

### **ESPECÍFICOS:**

- Medir a porcentagem do contato osso-implante (BIC) mediante histomorfometria.
- Medir a porcentagem de área ocupada pelo osso (BABT) mediante histomorfometria

## **METODOLOGIA**

### **CONSIDERAÇÕES SOBRE ANIMAIS, ÉTICA E PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO**

O protocolo de estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG (protocolo CEUA 041/2014). (anexo1). A manipulação dos animais seguiu as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O tamanho da amostra foi calculado utilizando o software G\*Power 3.112 com erros do tipo I ( $\alpha$ ) e do tipo II ( $\beta$ ) de 5% e 20%, respectivamente. Todos os animais foram fornecidos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG, Ponta Grossa / Paraná - Brasil).

### **PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Trinta e dois ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente 120 dias de idade e peso entre 400 e 450g, foram alojados em gaiolas plásticas (4 animais / gaiola) sob ciclo claro / escuro de 12 horas a 22°C com alimento e água ad libitum. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n = 8 / grupo) de acordo com a solução de gavagem oral recebida anteriormente (42 dias) à cirurgia de implante de tibia (soro fisiológico ou AAS 6,75mg / kg), sendo assim os grupos foram divididos da seguinte forma: Grupo 1 (CG-7) - gavagem oral de solução salina / 7 dias de pós-operatório; Grupo 2 (CG-28) - gavagem oral de solução salina / 28 dias de pós-operatório; Grupo 3 (AG-7) - gavagem oral de baixa dose de AAS / 7 dias de pós-operatório e Grupo 4 (AG-28) - gavagem oral de baixa dose de AAS / 28 dias de pós-operatório (Figura 2). A aspirina foi preparada diariamente sendo dispersa com 0,5% de carboximetilcelulose de sódio.

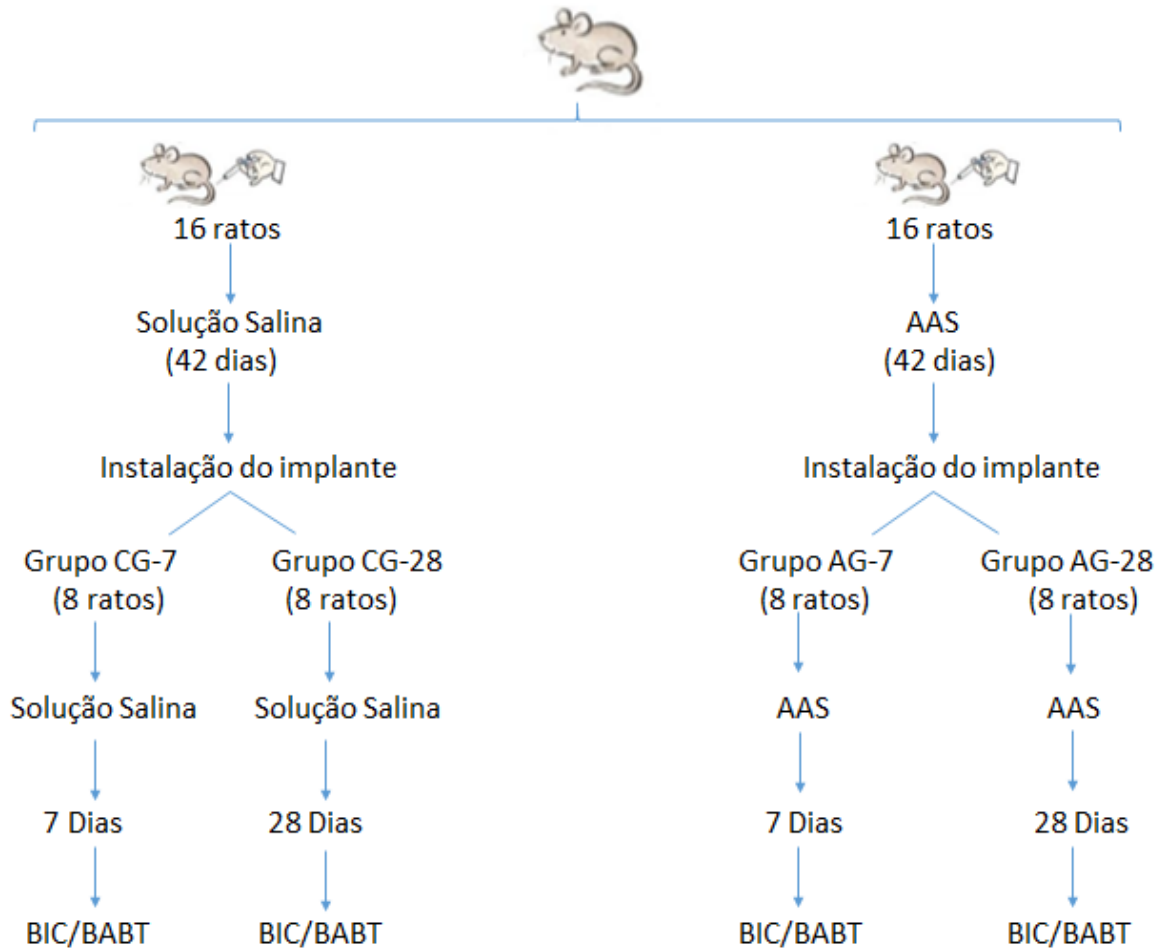


Figura 2: Divisão dos grupos conforme tratamento/período experimental (Fonte: O autor).

Em nosso estudo a escolha do período de administração prévio (42 dias) foi baseado nas metodologias descritas por (Smith et al., 1971<sup>[56]</sup>; Basselin et al., 2011<sup>[71]</sup>; Renna et al., 2009<sup>[72]</sup>) e a escolha da dose (6,75 mg/kg) foi baseada em duas etapas: (1) Doses usadas em publicações prévias (Akyazi et al., 2013<sup>[9]</sup>; Ghosh et al., 2011<sup>[73]</sup>), onde 6,75 mg/kg equivale 75 mg em humanos (Baixa dose – Função cardioprotetora) e posteriormente na segunda etapa foi realizado a conferência dessas doses usando uma fórmula matemática baseada na área de superfície corporal (BSA), como sugerido pela Food and Drug Administration (FDA), da seguinte forma (Reagan-shaw et al., 2007<sup>[74]</sup>):

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by } \frac{\text{Animal } K_m}{\text{Human } K_m}$$

Usando esta fórmula, 6,75 mg / kg de AAS em ratos é equivalente a 75 mg em humanos que é a dose clínica mais baixa utilizada.

## PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES:

Após 8 horas de jejum pré-operatório, os animais foram submetidos a procedimento anestésico intraperitoneal com cloridrato de ketamina 10% (40mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (15mg/kg). Após os procedimentos anestésicos, os animais foram submetidos à tricotomia da região interna da perna esquerda, seguida pela antissepsia com solução de iodopovidona. Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada na metáfise tibial.

Posteriormente, o local do implante foi preparado por perfuração mecânica sob irrigação abundante. O implante de titânio convencional (2,0 x 3,0 mm / Neodent®, Brasil) foi instalado com uma chave digital hexagonal (Neodent, Curitiba, PR, Brasil). A área operada foi suturada em planos, internamente com fio reabsorvível 5.0 (Vicryl® Ethicon; Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon; Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil).

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose única de penicilina associada à estreptomicina na dosagem 0,1 ml/kg de peso (Multibiótico Veterinário®; Vital Farma Ltda, São Sebastião do Paraíso, MG, Brasil) e 20mg/kg de dipirona sódica (Dipirona Ibasal®; Laboratório Ibasal Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil). Um operador treinado realizou o procedimento cirúrgico (Figura 3)

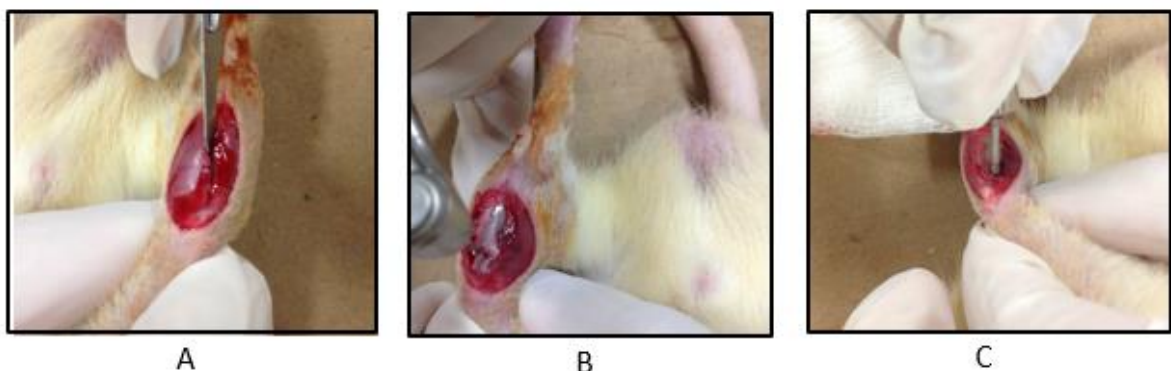


Figura 3: **Procedimento cirúrgico para instalação do implante.** Em A observamos a incisão realizada na metáfise tibial, em B o momento da perfuração óssea e em C a instalação do implante. (Fonte: O autor).

## OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS (BIC/BABT)

Os animais foram mortos aos 7 e 28 dias, conforme grupo experimental, com sobre dose do mesmo anestésico e deslocamento cervical para que se procedesse a coleta das amostras.

Após a morte dos animais, as tíbias contendo os implantes foram removidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas e depois lavadas com água corrente. Posteriormente, as amostras foram seccionadas a partir da porção superior do implante, paralelamente ao seu longo eixo, com auxílio de uma cortadeira de precisão Miniton (Struers, Ballerup, Hovedstaden, Dinamarca) com velocidade de 100 rpm. Esta etapa resultou em cortes com espessura média de 1 centímetro.

Em seguida foi realizada a desidratação com álcool etílico, seguindo a sequência de proporcionalidade, o primeiro banho foi feito com álcool 70%, seguido por álcool 80%, álcool 90% e álcool absoluto 100%. Cada banho teve duração de 7 dias e após o último banho a amostra foi submergida em um banho de xilol por 24 horas.

Após as amostras foram incluídas em resina LR White Hard Grade (London Resin Company, Berkshire, Inglaterra). O procedimento de inclusão foi realizado em placas de acrílico com um cimento a base de acrilato onde primeiro foi feito o banho em 70% de álcool etílico + 30% de resina, depois um banho em 80% de álcool etílico + 20% de resina, após um banho em 90% de álcool etílico + 10% de resina e finalmente um banho em 100% de resina, os banhos tiveram duração de 7 dias. Após este procedimento, foi adicionado uma gota de peróxido de benzoíla (catalisador) para cada 10 ml de resina em concentração de 100% e em seguida a solução obtida foi despejada em um recipiente contendo a amostra conforme a figura 4.

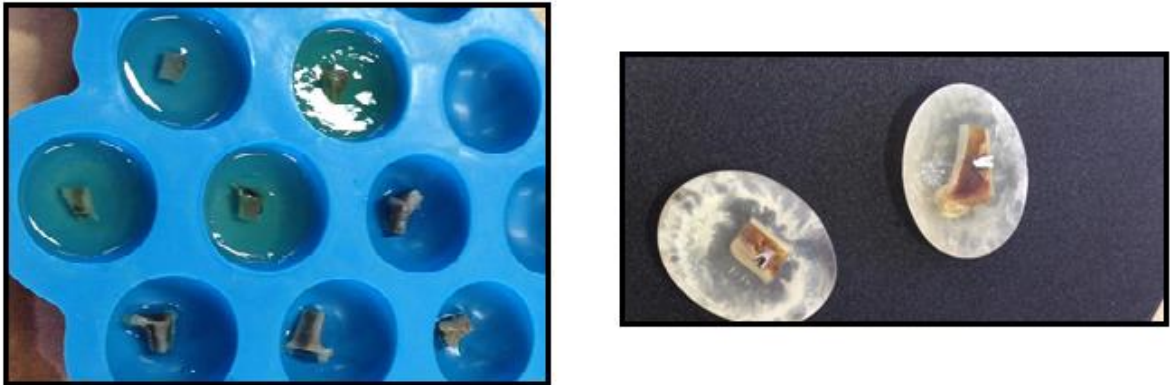


Figura 4: **Inclusão em Resina de polimetilmetacrilato LR White (London ResinCompany, Berkshire, Inglaterra).** (Fonte o autor )

Os cortes foram submetidos ao desgaste com o auxílio de uma Politriz (Politriz® – Tegra System Struers, Denmark) utilizando papeis abrasivos de carbeto de silício nas granulações de (120, 220, 320, 500, 1200 e 2000) a 100 rpm.

A espessura final do corte foi verificada em intervalos regulares, sendo de 40  $\mu\text{m}$ . Cada peça anatômica com o implante gerou uma lâmina, as amostras foram submetidas à coloração por azul de toluidina mediante o seguinte procedimento: primeiro banho em água oxigenada a 10% durante 5 minutos, segundo banho em ácido fórmico a 10% por durante 3 minutos, terceiro enxágue em água destilada, quarto banho em solução de metanol a 20% por 20 minutos, quinto enxágue em água destilada, sexto banho em solução de azul de toluidina por 1 a 2 minutos. Em seguida, banho em água por 1 minuto seguido por secagem delicada com papel macio e por último a colagem das lamínulas de vidro com resina Entellan (Merck, São Paulo, São Paulo, Brasil) e remoção do excesso de material com solventes.

A solução de azul de toluidina foi preparada com 10g de azul de toluidina (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), 1g de tetraborato de sódio e 100ml de água destilada.

A avaliação histomorfométrica foi realizada usando um microscópio óptico (Axion Imager A1M, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Axiocam ICc3, Carl Zeiss, Alemanha). O processo de osseointegração foi avaliado através de medidas de contato osso-implante (BIC) e área óssea mineralizada (BABT) usando o software Image Tool 3.0 (San Antonio Dental School, Universidade do Texas Health Science, TX, EUA).

Na análise BIC as regiões de contato do osso com o implante foram subtraídas do perímetro total do implante (figura 5). Na área óssea entre as roscas (BABT), primeiramente obtivemos a área total da rosca e a área ocupada por espaço vazio (sem preenchimento osseo), e depois determinamos o percentual de área total da rosca ocupadas por tecido ósseo. Essas avaliações foram realizadas nas três primeiras roscas do implante por um único examinador cego e calibrado (figura 6). A figura 07 mostra um fluxograma esquemático usado no estudo.

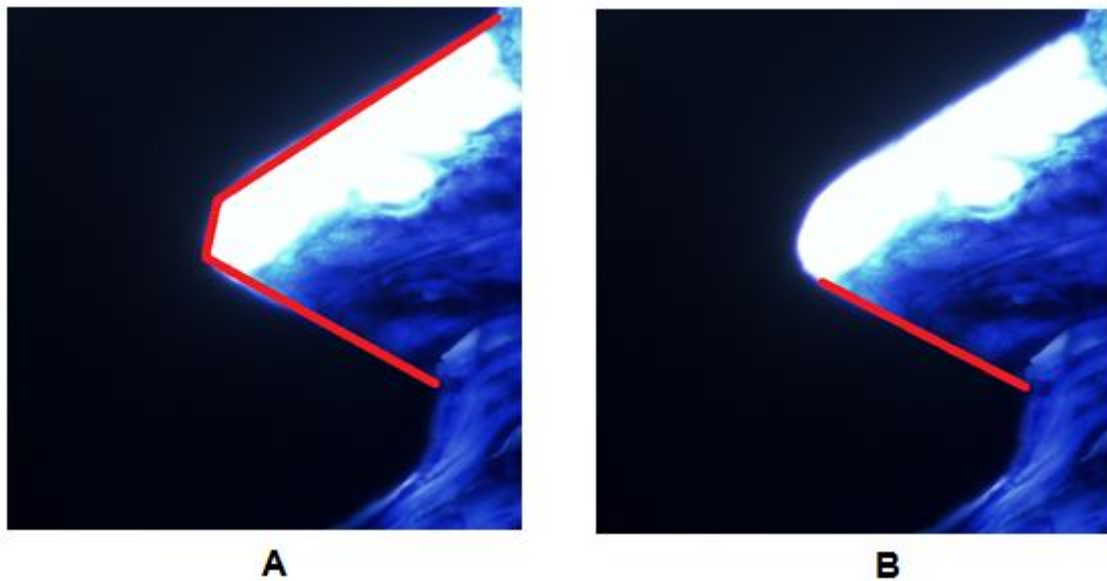


Figura 5: **Análise BIC**. Em A mede-se o perímetro total do implante e em B a região de contato do osso com implante (Fonte: O autor).

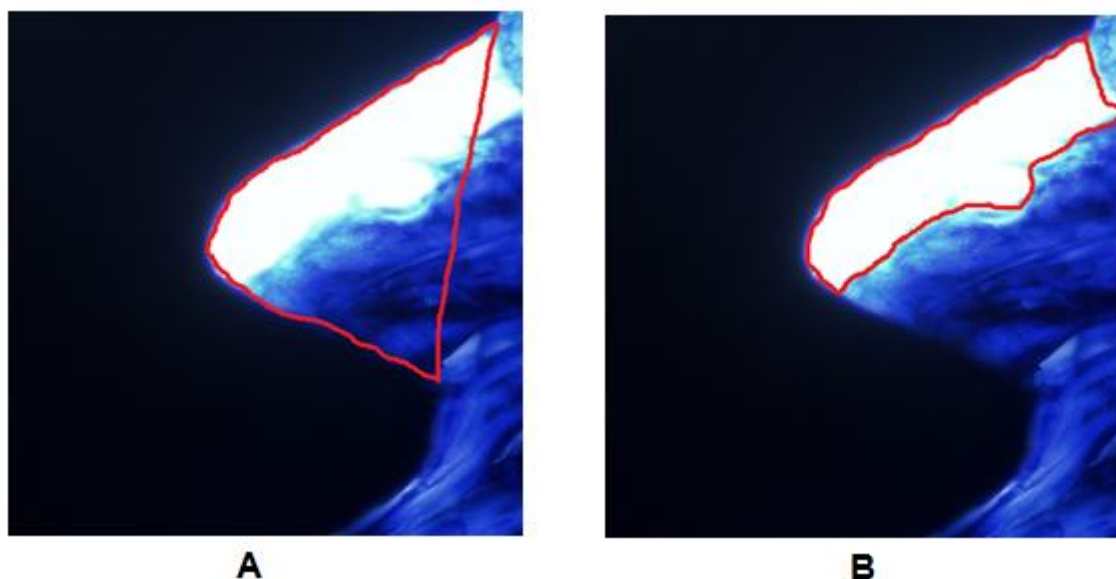


Figura 6: **Análise BABT**. Em A mede-se área total da rosca e em B a área ocupada por espaço vazio (Fonte: O autor)

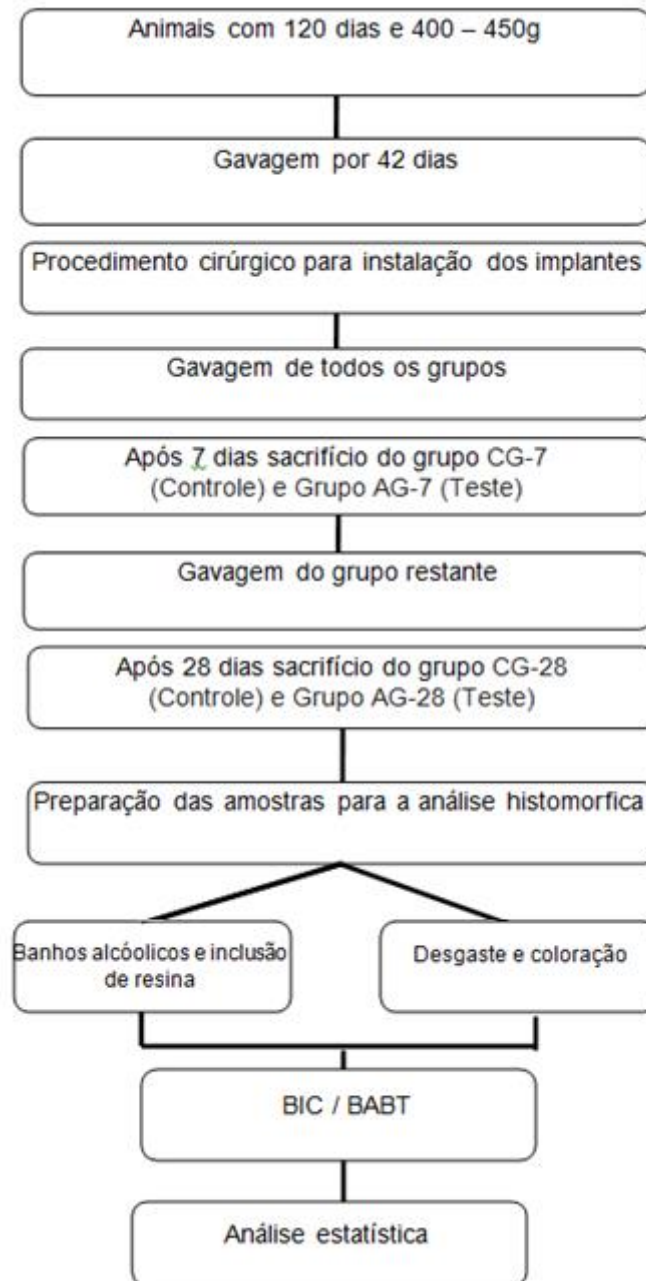


Figura 7: **Desenho experimental.** (Fonte: O autor).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Considerando-se dados paramétricos, realizou-se ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey post-hoc para a comparação múltipla entre os grupos. O nível de significância foi ajustado em 5%. O software Graphpad Prism



(versão 6.0, Graphpad Software Inc, EUA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

## RESULTADOS

A análise estatística referente ao parâmetro BIC demonstrou uma redução significativa no contato osso-implante no dia 7, no grupo de animais em tratamento com aspirina (AG-7) em comparação ao grupo controle (CG-7). No entanto, no dia 28 não foi detectada diferença entre os grupos (CG-28 x AG-28,  $p > 0,05$ ). Além disso, a análise mostrou diferença entre: AG-7 x CG-28 e AG-7 x AG-28 (Gráfico 01 e Figura 8).

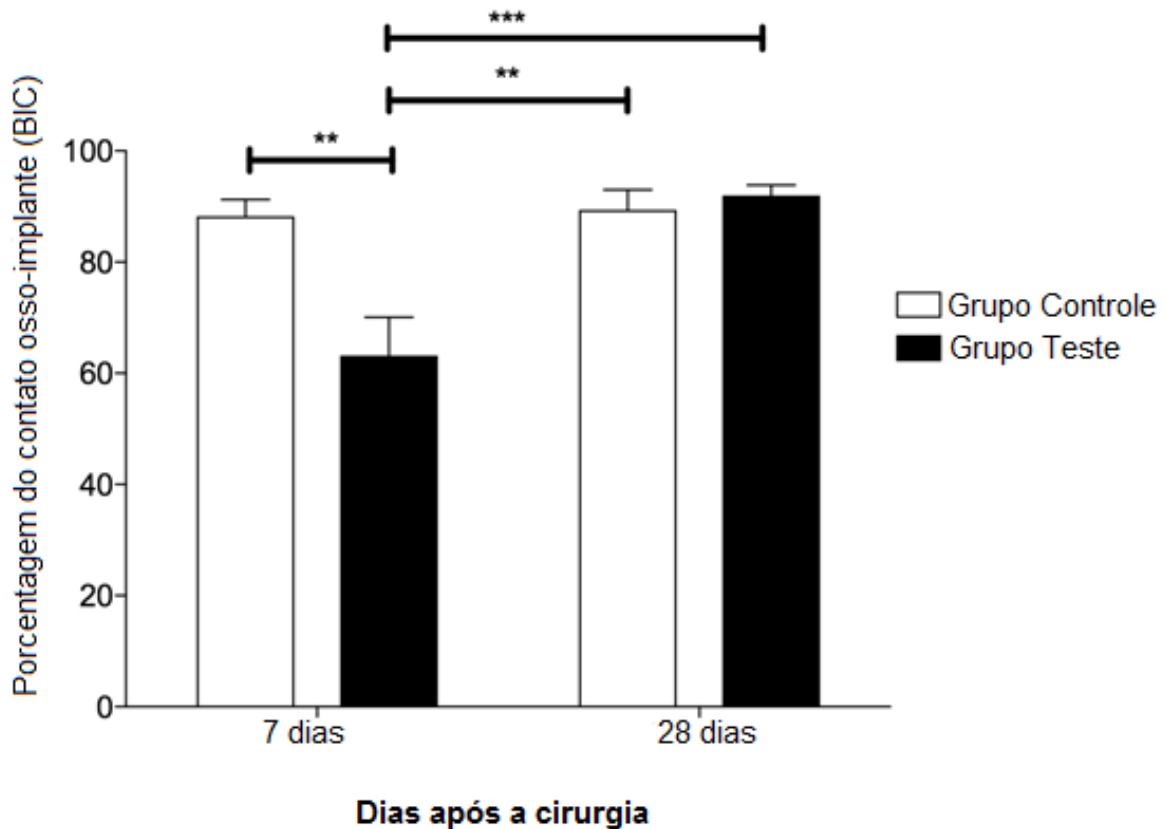


Gráfico 01: Efeito do uso crônico de baixa dose de aspirina sobre a porcentagem de contato osso-implante (BIC). Os dados representam média  $\pm$  SE (n = 8 animais / grupo). (Fonte: O autor).

\* indicam diferença significativa entre os grupos (\*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Teste estatístico: ANOVA – Post-hoc Tukey / Software GraphPad Prism, Version 6.0.

A análise referente porcentagem de área ocupada pelo osso (BAPT) não mostrou diferença significativa entre os grupos (CG-7 x AG-7 e CG-28 x AG-28,  $p >$

0,05). Entretanto, a análise demonstrou um resultado semelhante ao parâmetro BIC, no qual houve diferença significativa entre os grupos: AG-7 x CG-28 e AG-7 x AG-28 (Gráfico 02 e Figura 8).

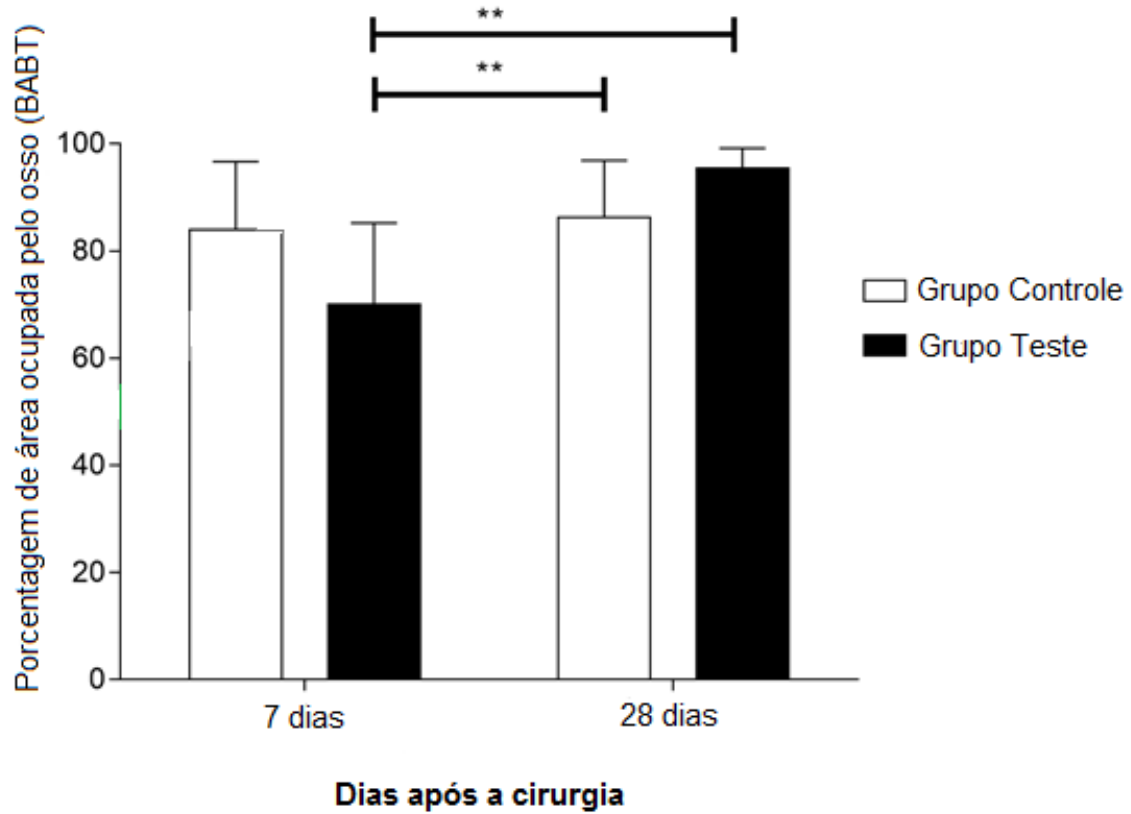


Gráfico 02: Efeito do uso crônico de baixa dose de aspirina na porcentagem de área ocupada pelo osso (BAPT). Os dados representam média  $\pm$  SE (n = 8 animais / grupo). (Fonte: O autor).

\* indicam diferença significativa entre os grupos (\*\* $p \leq 0.01$ ). Teste estatístico: ANOVA – Post-hoc Tukey / Software GraphPad Prism, Version 6.0.

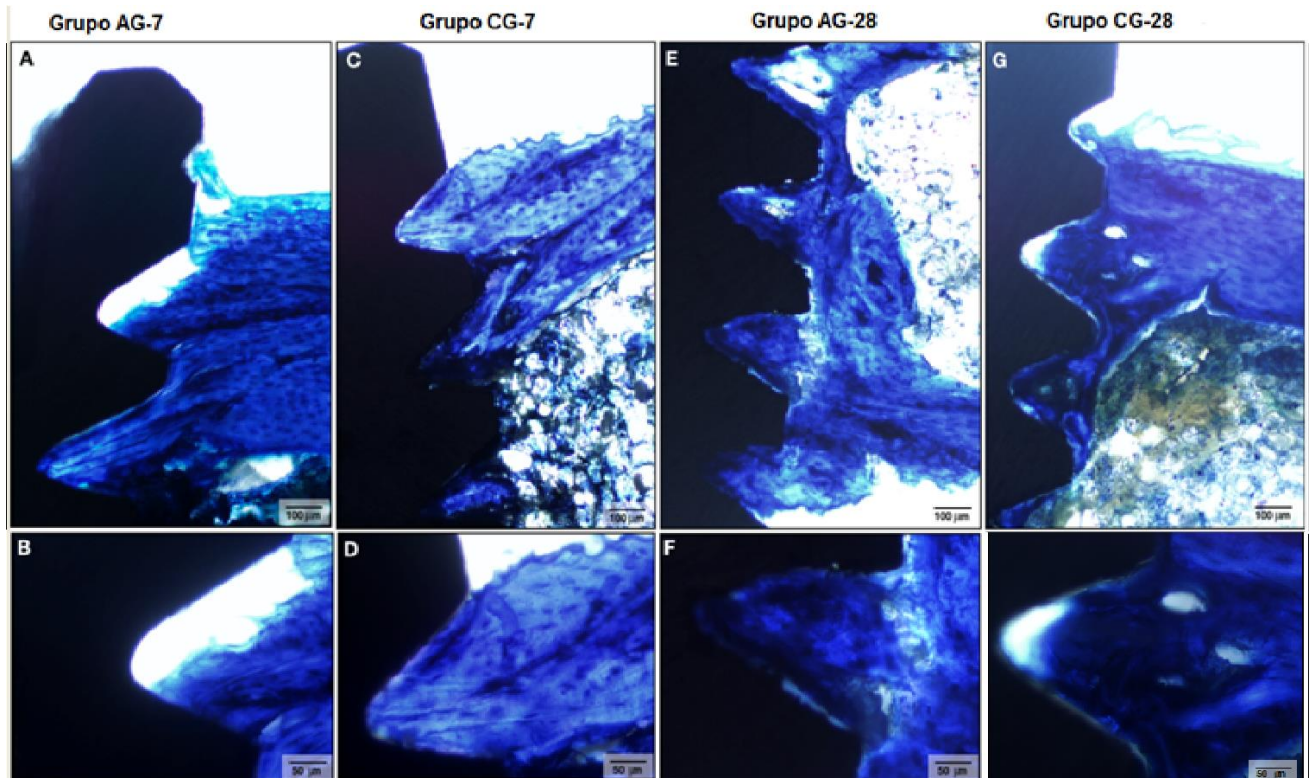


Figura 8: **Lâminas da análise histológica.** Comparação entre os grupos CG-7, AG-7, CG-28 e AG-28. Em (A e B), aumento de 100 µm e 50 µm respectivamente, observa-se redução do contato osso-implante nos animais em tratamento com aspirina (AG-7) e em (C e D), grupo controle, observa-se o implante osseointegrado. Em (E e G) observa-se um crescimento ósseo semelhante em toda a superfície do implante (Fonte: O autor)

## DISCUSSÃO

O AAS é um medicamento bastante conhecido e consumido no mundo todo. Devido a sua ação de inibir a síntese de PG mediante a inativação da COX apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antitérmicas. Em 1980 FDA aprovou o uso de baixas doses de AAS para o tratamento na prevenção primária e, principalmente, secundária de doenças cardiovasculares (DCV). Esta indicação clínica deve-se a inibição da agregação plaquetária em decorrência da diminuição da síntese de tromboxano, mediada pela COX-1 nas plaquetas (Xu et al., 2014<sup>(18)</sup>; Akinwusi et al., 2013<sup>(75)</sup>; Cryer et al., 2014<sup>(76)</sup>).

Em decorrência desta importante indicação clínica, cada dia é mais comum o atendimento odontológico de pacientes em uso crônico de baixa dose de AAS, que buscam na implantodontia a reabilitação oral. Atualmente estudos relatam o efeito negativo dos AINES no processo de osseointegração, porém o real efeito do uso crônico e em baixas doses de AAS é desconhecido.

Nesse contexto, este estudo observou um impacto negativo da terapia de baixa dose de AAS no contato osso implante do grupo de animais que foram sacrificados 7 dias após o procedimento cirúrgico, indicando um possível efeito biológico desse medicamento nas fases iniciais do processo de osseointegração. Nossos resultados corroboram com estudos na literatura que também demonstraram um efeito deletério da inibição da COX durante os primeiros estágios do processo de reparo ósseo. Gerstenfeld e colaboradores, 2003 <sup>[35]</sup> em um estudo cinético (1-42 dias) de expressão de COX durante a consolidação da fratura do fêmur demonstraram que, embora a COX-1 não tenha mudado durante o período de avaliação, os níveis de RNAm de COX-2 revelaram pico de expressão durante os primeiros 14 dias de cicatrização e retornaram aos níveis basais no dia 21, o que também confirma que a COX-2 é induzida localmente em resposta a lesões. Além disso, os autores descobriram que o uso de um inibidor não seletivo de COX (Cetorolaco) levou a um atraso na consolidação da fratura, mas no dia 35 todas as fraturas (controle e grupos de testes) estavam consolidadas (Gerstenfeld C, L et al., 2003 <sup>[35]</sup>).

Outro estudo realizado avaliou a liberação de prostaglandinas E e F das tíbias de coelhos e do músculo circulante após fratura e fixação, constatou-se que em até 14 dias após a operação a liberação de PGs nas tíbias fraturadas foi maior que o controle, no entanto após 28 dias a liberação de PGs foi semelhante ao controle (Dekel S, et al., 1981 <sup>[77]</sup>). Além disso, em outra pesquisa foi avaliado a variação de celecoxib (AINES seletivo para COX2) na cicatrização de fraturas em ratos e observou que quando administrado antes da fratura ou 14 dias após não havia alteração na cicatrização óssea, constatando que durante os estágios iniciais do reparo da fratura os medicamentos inibidores da COX-2 aumentam a proporção de não união (Simon et al., 2002 <sup>[78]</sup>).

Também foi relatado em nosso estudo que não houve diferença estatisticamente significativa na fração de área ocupada pelo osso (BABT) nos grupos experimentais e controle. O fato de haver diferença estatisticamente significativa em BIC, mas não em BABT pode ser devido a própria análise, visto que em determinadas roscas o osso recém formado não entra em contato com o implante, o que gera um percentual alto da fração de área ocupada (BABT) e um contato osso-implante baixo (BIC). Corroborando com tais elucidações um estudo observou que durante a primeira semana a formação óssea se dá a partir do osso

cortical circundante e após 5 semanas os ossos formados preenchem as regiões próximas do implante (Carvas B, J, et al., 2011 <sup>[79]</sup>). Esses resultados podem explicar os nossos achados onde BAPT não demonstrou diferença significativa, visto que devido a neoformação óssea iniciar do osso cortical circundante há uma demora até haver contato do osso com o implante. Em outro estudo (Campos et al., 2015 <sup>[80]</sup>) afirmam que a análise BIC não representa o implante geral na competência biomecânica do sistema ósseo.

Além disso, um estudo realizado para avaliar a análise histomorfométrica da interface de dois diferentes substratos de implantes, observou que após a terceira semana não houve mais alterações na mensuração do BAPT, pois o osso estaria em processo de maturação óssea e menor formação (Silva R, J, 2014 <sup>[81]</sup>). Outros autores também relatam que a fração de área ocupada e a porcentagem de contato osso-implante são semelhantes no grupo que fez uso de AINE com o grupo controle após 18 semanas da cirurgia (Carvas B J, et al., 2011 <sup>[79]</sup>).

Em nossa pesquisa foi utilizado a menor dose prescrita para cardioproteção (6,75 mg/kg), o que equivale aproximadamente 75-80 mg em humanos, esta dose é comumente usada na prática clínica, pois estudos relataram que as lesões gástricas estão diretamente associada com a dose, e indivíduos que fazem uso de uma maior dose cardioprotetora (300 mg) tem mais riscos de desenvolver danos gastrointestinais ou outras complicações durante o tratamento.

Neste contexto, os resultados do presente estudo devem ser avaliados com cautela, pois doses mais altas usadas para a mesma indicação clínica (por exemplo, 300mg) podem levar a um impacto diferente do tratamento com AAS no processo de osseointegração, além disso, nosso estudo foi realizado em modelo animal e os implantes não receberam carga, sendo assim, outros estudos em animais e humanos são sugeridos para esclarecer este importante problema clínico.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que uso crônico e em baixa dose do ácido acetilsalicílico em modelo animal tem ação negativa no processo de osseointegração apenas na fase inicial (7 dias), no entanto, nos estágios finais (28 dias), esse efeito parece não ser relevante considerando os parâmetros BIC e BAPT.

## REFERÊNCIAS

- [1] GAVIRIA, L, et al., Current trends in dental implants. **The Korean Association Oral Maxillofacial Surgeons**, v.40, p.50-60, 2014.
- [2] ABRAHAM, M, C. A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. **The open dentistry journal**, v.8, p.50-55, 2014.
- [3] Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios (ABIMO). Disponível em: <[https://abimo.org.br/?post\\_type=clippings&p=960](https://abimo.org.br/?post_type=clippings&p=960)>. Acesso em: 22/04/2017.
- [4] MAVROGENIS A, F, R, D, J; PARVIZI, G,C. Biology of implant osseointegration. **Journal Musculoskelet Neuronal Interact**, v.9, n.2, p.61-71, 2009.
- [5] BRANEMARK P, I. Osseointegration and its experimental background. **Journal Prosthet Dent**, v.50, n.3, p.399-410, 1983.
- [6] TERHEIDERN L. Clinical study on survival rate of short implants placed in the posterior mandibular region: resonance frequency analysis. **Clinical Oral Implants**, v.00, p.1-7, 2014.
- [7] CARVALHO, A, W; CARVALHO, S, D, R; SANTOS, R, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: Avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.3, p. 448-464, 2004.
- [8] MENDES, T, R, et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de reumatologia**, v.52, n.5, p.767-782, 2012.
- [9] AKYAZI I, et al. Long-term aspirin pretreatment in the prevention of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. **World journal of gastroenterology**, v.19, n.19, p. 2894-2903, 2013.
- [10] BARUDZIC N, et al. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on oxidative stress in isolated rat heart. **Molecular and cellular biochemistry**, v.1, n.2, p.301-311, 2013.
- [11] MURTAZA G, et al. Interaction analysis of aspirin with selective amino acids. **Acta poloniae pharmaceutica**, v.71, n.1, p.139-143, 2014.
- [12] KOVACS E, G, et al. Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods. **Thrombosis research**, v.133, n.5, p.811-816, 2014.
- [13] CHIKAZU D, et al. Cyclooxygenase-2 activity is essential for the osseointegration of dental implants. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v.36, n.5, p.441-446, 2007.
- [14] CHIKAZU D, et al. Bone Morphogenetic Protein 2 Induces Cyclo-oxygenase 2 in Osteoblasts via a Cbfa1 Binding Site: Role in Effects of Bone Morphogenetic Protein

2 In Vitro and In Vivo. **Journal of bone and mineral research**, v.17, n.8, p.1430-1440, 2002.

[15] KALYVAS, G, D; TARENIDOU, M. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. **Journal of Oral Science**, v.50, n.3, p.239-246, 2008.

[16] GUM P, A, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v.88, n.3, p.230-235, 2001.

[17] BATLOUNI M. Anti-inflamatorios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebro-vasculares e renais. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.94, n.4, p.556-563, 2010.

[18] XU J, et al. A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. **Lipids in health and disease**, v.13, n.63, p.1-7, 2014.

[19] ARIZMENDI J, A, et al. Oseointegración: Una cascada de eventos. **Revista Facultad de Odontología U de A**, v.12, n.1, p.27-34, 2000.

[20] LEMUS C, L, M; ALMAGRO, U, Z; CASTELL, C, L, A; Origen y evolución de los implantes dentales. **Revista Habanera de ciencias médicas**, ciudad de la Habana, v.8, n.4, 2009.

[21] Oral and maxillofacial surgeons: the experts in face, mouth and jaw surgery. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Disponível em: <<http://www.aaoms.org/conditions-and-treatments/dental-implants>>. Acesso: 17/10/2016.

[22] BRÄNEMARK, P, I; ZARB, G; ALBR E, T. Tissue Integrated Prosthesis Osseointegration in Clinical Dentistry. **The Journal of prosthetic dentistry**, Chicago, v.55, n.4, p.103-107, 1985.

[23] TERHEYDEN, H, et al. Osseointegration – communication of cells. **Clinical oral implants research**, v.23, p.1127-1135, 2012.

[24] MACKIE IJ, P, R, Vascular integrity and platelet function. **International Anesthesiology Clinics**, v.23, n.2 p.3-21, 1985.

[25] HOFFBRAND, A, V; MOSS, P, A, H. Fundamentos em Hematologia. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

[26] MOUNTZIARIS M, P; MIKOS, G, A. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. **Tissue Engineering Part, B, Reviews**, v.14, n.2, p. 179-186, 2008.

[27] BOYCE B, F; XING L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.473, n.2, p.139-146, 2008.

- [28] YAO Z, et al. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. **Journal Biological Chemistry**, v.283, n.15 p.9917-9924, 2008.
- [29] MURILLO A, et al. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. **Biological Research**, Santiago, v.43, n.2 p.205-224, 2010.
- [30] ARAGÃO V, D, N, et al. Remodelação das estruturas teciduais da interface osso/implante. **Full Dentistry in Science**, v.2, n.7, p.265-269, 2011.
- [31] ARAGÃO V, D, N. **Níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10 em pacientes com tuberculose e infecções bacterianas**. 2002, 140 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais na Faculdade de Medicina de Botucatu) - Faculdade de Medicina da universidade estadual de São Paulo – UNESP, Botucatu, São Paulo, 2002.
- [32] GIL H, T, F, I, et al. Bases fisiológicas de la regeneración ósea. El proceso de remodelado. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, n.2, p.151-7, 2006.
- [33] RAISZ L, G. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. **Osteoarthritis Cartilage**, v.7, n.4, p.419–421, 1999.
- [34] ZHANG X, et al. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **The Journal of clinical investigation**, v.109, n.11, p.1405-1415, 2002.
- [35] GERSTENFELD C, L, et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n.4, p.670-675, 2003.
- [36] DUCY, P, et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v.89, n.5, p.747–754, 1997.
- [37] NAKASHIMA K, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**. v.108, n.1, p.17–29, 2002.
- [38] RIBEIRO V, F, et al. Papel dos AINES inibidores seletivos de cox-2 sobre o metabolismo e formação ósseos ao redor de implantes de titânio. Revisão de literatura. **Revista periodontia**, v.1, n.3, p. 15-22, 2007.
- [39] MARIE PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. **Gene**, v.316, n.16, p.23-32, 2003.
- [40] HOFBAUER L, C, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4367-70, 1999.



- [41] CHAUDHARY L, R; HRUSKA K, A. The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 81, n.2, p. 304–311, 2001.
- [42] CHANG C, P; LANG P, N; GIANNOBILE V, W. Evaluation of Functional Dynamics during Osseointegration and Regeneration Associated with Oral Implants, **Clinical Oral Implants Res**, v. 21, n.1, p.1–12, 2010.
- [43] YAMAGUCHI A; KOMORI T; SUDA T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. **Endocrine Reviews**, v. 21, n.4, p.393-411, 2000.
- [44] PARK J, et al. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. **Biomaterial**, v.28, n.122, p. 2772-2782, 2007.
- [45] LAN J, et al. The effect of combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin-like growth factor-I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Periodontology**, v. 77, n.3, p. 357-63, 2006.
- [46] FRANCO G C N, et al. Uma análise crítica sobre a viabilidade do uso dos inibidores seletivos de CO X-2 em Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n.1, p. 75-81, 2006.
- [47] HO M, L, et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. **Biochemical Pharmacology**, v.58, n.6,p.983-900, 1999
- [48] GOODMAN S, T, M, T, et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, n.6, p.1164-1169, 2002.
- [49] JEFFCOAT M, K, The effect of systemic flurbiprofen on bone supporting dental implants. **The Journal of the American Dental Association**, v.126, n.6,p. 305-311, 1995.
- [50] FU J, H, et al. Statins, Glucocorticoids, and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Their Influence on Implant Healing. **Implant Dentistry**, v.21, n.5, p.362-367, 2012.
- [51] KENNETH K, W. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. **Thrombosis Research**, v.110, n.5-6, p.273–276, 2003.
- [52] VANE J, R; BOTTING R, M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**, v.110,n.5-6, p. 255–258, 2003.
- [53] VANE J, R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v.5, n.25, p. 231-232, 1971.

- [54] MOREIRA M, D; MORAIS D, V; DUTRA P, O. Agentes antiplaquetários e antitrombóticos na doença coronariana estável. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**. v.13, p.1-5, 2008.
- [55] PIPER P, J; VANE J, R. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. **Nature** v. 223, p.29-35, 1969.
- [56] SMITH J, B; WILLIS A, L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nature**, v.231, n.25, p.235-237, 1971.
- [57] HEMLER M; LANDS W; SMITH W, L. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, n.18 p.5575-5579, 1976.
- [58] SMITH J, W, et al. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult and aged rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v.71, n.1, p.233-238, 2002.
- [59] MILLER S, B. Prostaglandins in health and disease: an overview. **Seminars in arthritis and rheumatism**,v.36, n.1, p.37-49, 2006.
- [60] MARNETT L, J, et al. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. **The Journal of biological chemistry**,v. 274, n.33, p.22903-22906, 1999.
- [61] PATRONO C; ROCCA B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 59, n.5, p. 285-289, 2009.
- [62] KUMMER C, L; COELHO T, C. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v.52, n.4, p.498-512, 2002
- [63] RUIZ P, A, et al. Interrelación de equilibrio tromboxano A2-prostaciclina y su modificación cuando se ingiere aspirina. **Revista Cubana de Estomatología**, v.52, n.1, p.103-110, 2015.
- [64] KIRKBY N, S, et al. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 predicts cyclooxygenase-2 in the lungs of LPS-treated mice but not in the circulation: implications for a clinical test. **Faseb journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.27, n.10, p.3938-46, 2013.
- [65] PATRIGNANI P; PATRONO C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et biophysica acta**, v.1851, n.4, p. 422-432, 2015.
- [66] Alencar A, M, M; Rocha G, F, M; Pinheiro N, S, D. Inflamação e sua modulação por anti-inflamatórios não esteroides: Riscos e Benefícios. **Ciência animal**,v.15, n.1,p.33-41, 2005.

- [67] HILARIO M, O; TERRERI M, T; LEN C, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de pediatria**, v.82, n.5, p.206-212, 2006.
- [68] GACION Z. The real dimension of analgesic activity of aspirin. **Thrombosis Research**, v.110, n.5-6, p.361–364, 2003.
- [69] OLIVEIRA M, M, G. Antiagregantesplaquetário. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 15 n.1. p. 21-27,2001.
- [70] COUTO, A, M. Farmacologia Cardiovascular Aplicada à Clínica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Revinter. 1998.
- [71] BASSELIN M, et al. Anti-inflammatory effects of chronic aspirin on brain arachidonic acid metabolites. **Neurochem Res**, v.36, n.1, p. 139-145, 2011
- [72] RENNA N, et al. Effect od chronic aspirin administration on an experimental model of metabolic syndrome. **Clin exp pharmacol physiol**, v 36, n.2, p.162-168, 2009.
- [73] GHOSH A, et al. Effect of chronic administration of low dose aspirin on haloperidol induces catalepsy in rats. **Journal Pharmacol Pharmacother**, v.2, n.3, p.198-200, 2011.
- [74] REAGAM-SHAW S, et al. Dose translation from animal to human studies revisited. **The faseb journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.
- [75] AKINWUSI P, et al. Low dose aspirin therapy and renal function in elderly patients. **International journal of general medicine**, v. 6, p.19-24, 2013.
- [76] CRYER B; MAHAFFEY K, W. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. **Journal of multidisciplinary healthcare**, v.7, p. 137-146, 2014.
- [77] DEKEL S, et al. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. **The journal of bone and joint surgery**, v. 63, n. 2,p. 185-189, 1981.
- [78] SIMON M, A, et al. Cyclo-Oxygenase 2 Function Is Essential for Bone Fracture Healing. **Journal of bone and mineral research**, v.17, n.6, p.963-976, 2002.
- [79] CARVAS B, J, et al. No deleterius effect of low dose methotrexate on titanium implant osseointegration in a rabbit model. **Clinics**, v.66, n.6, p.1055-1059, 2011.
- [80] CAMPOS B, E, F, et al. Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in canine model. **Med oral patol oral cir bucal**, v.20, n. 4, p. 471-179, 2015.
- [81] SILVA R, J. Avaliação Histomorfométrica de Implantes Dentários Confeccionados em Titânio comercialmente puro Grau IV e liga de Ti-6Al-4V Grau V.

2014. 13-14 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Odontologia, Universidade UNIGRANRIO, 2014.

## ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Uso Animal Universidade Estadual de Ponta Grossa – Processo CEUA 041/2014/ Protocolo UEPG 17394/2014

**UEPG**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 041/2014**

Protocolo UEPG – 17394/2014

**Título** – Avaliação na osseointegração periimplantar em ratos submetidos a baixa dose de aspirina

**Data de Entrada – 14/10/2014**

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo – 14/10/2014 a 14/10/2016**

**Considerações**

Prezado Professor Gilson César Nobre Franco e mestranda Katherine Vargas Sanchez:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 72 (setenta e dois) ratos wistar machos.

**SITUAÇÃO:** APROVADO.

Ponta Grossa, 7 de novembro de 2014.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA -  
PROPEP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof.<sup>a</sup> *Dr. Maria Maria Lodi*  
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROPEP  
Fone: (042) 3220-3264