

CONIC-SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: OS BENEFÍCIOS DO RESVERATROL NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES DE TITÂNIO.

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: ODONTOLOGIA

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE PAULISTA

AUTOR(ES): PAULA RODRIGUES PIRES

ORIENTADOR(ES): FERNANDA VIEIRA RIBEIRO

COLABORADOR(ES): BRUNA GHIRALDINI, CAROLINA ALGAYER ATMANSPACHER, FABIANO CIRANO, MARCIO CASATI, MARKUS ALGAYER ATMANSPACHER, RENATO CASARIN, SUZANA PIMENTEL

Realização:



Apoio:



OS BENEFÍCIOS DO RESVERATROL NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES DE TITÂNIO.

1. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do Resveratrol, um produto natural presente em inúmeras plantas, na retenção biomecânica de implantes de titânio em ratos após administração contínua. Vinte ratos Wistar adultos foram incluídos neste estudo e um implante de titânio foi inserido na tíbia. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, para administração oral diária de solução de placebo (Grupo de Controle), ou 10 mg/kg de Resveratrol (Grupo RESV), durante 30 dias. Após o tratamento, os animais foram sacrificados e os implantes foram removidos por aplicação de uma força contra-torque. A força máxima necessária para a ruptura da interface osso-implante foi registrada usando um torquímetro. Os dados foram avaliados por meio de Mann-Whitney. Comparações intergrupos demonstraram que com o uso crônico de Resveratrol aumentou significativamente as médias de torque para a remoção do implante ($5,67 \pm 2,15$ N/cm), quando comparado ao grupo controle ($4,11 \pm 0,88$ N/cm) ($p < 0,05$). Em conclusão, o presente estudo mostra que o uso de Resveratrol pode influenciar positivamente retenção biomecânica de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos após a administração contínua.

2. INTRODUÇÃO

Implantes de titânio dentários ganharam um lugar importante na odontologia nas três últimas décadas, já que representam uma estratégia de tratamento previsível para substituir dentes perdidos na reabilitação de pacientes desdentados totais e parcialmente, oferecendo uma sobrevida e taxa de sucesso relativamente alto (Simonis et al. 2010). No entanto, tem sido evidenciada uma ampla gama de 3 fatores de risco potenciais que podem prejudicar a cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio, contribuindo para falhas de implantes dentários (Zupnik et al. 2011).

O Resveratrol (3,5,49 - hydroxystilbene) é um produto natural presente em inúmeras plantas e é encontrado especialmente em alta concentração no vinho tinto e uvas (Singh et al. 2000). Tem sido demonstrado que o Resveratrol possui uma vasta gama de efeitos biológicos positivos que podem contribuir para a terapia de várias doenças. Entre seus efeitos, o Resveratrol pode apresentar atividade anti-câncer (Signorelli & Ghidoni 2005, van Ginkel et al. 2007, Whitlock & Baek 2012), atividade indução de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) (Bhatt et al. 2011, Soufi et al. 2012), melhora o controle metabólico do diabetes (Lee et al. 2011, Soufi et al. 2012), protege contra a degeneração neural (Della-Morte et al. de 2009, Schmatz et al. 2009, Li et al. 2012), e evita doenças cardiovasculares (Wang et al. 2005, Bhatt et al. 2011, Breen et al.

2012). Além disso, foi referido que o Resveratrol pode beneficiar na neoformação óssea (Boissy et al. 2005, Dai et al. 2007).

Evidências têm mostrado que os efeitos favoráveis do Resveratrol sobre o metabolismo ósseo são ambas relacionadas com a capacidade deste composto em antagonizar osteoclastogênese e para promover a osteoblastogênese (Mizutani et al. 1998, Backesjo et al. 2006, Tseng et al. 2011). Apesar de haver relatórios sobre o impacto benéfico do Resveratrol sobre o metabolismo ósseo, os efeitos do Resveratrol na cicatrização óssea ao redor dos implantes dentários não foram investigados até agora.

Considerando que os implantes dentários ainda apresentam falhas e considerando que o Resveratrol tem propriedades positivas sobre a cicatrização de ossos, a finalidade do presente estudo foi avaliar os efeitos do Resveratrol na força de contra-torque de implantes de titânio em ratos após a administração contínua.

A hipótese era de que o uso crônico de Resveratrol pode melhorar a retenção biomecânica de implantes de titânio dentários.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do resveratrol na retenção biomecânica de implantes de titânio em ratos, após administração contínua.

4. METODOLOGIA

Foram utilizados 20 ratos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, SPF), machos, com idade aproximada de 10 semanas. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no biotério da Universidade Paulista UNIP, sob as mesmas condições ambientais, em gaiolas plásticas, tratados com ração para animais de laboratório e água “ad libitum”.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Paulista UNIP.

Os implantes de titânio (Titanium Fix®, AS Technology Ltda., São José dos campos, SP, Brasil) foram inseridos nas tíbias, de acordo com um método descrito em estudos anteriores (Ribeiro et al. 2009). Resumidamente, a anestesia geral foi obtida por administração intramuscular de cetamina (0,5 mL/kg). A pele foi lavada com sabão cirúrgico de iodo. Uma incisão de aproximadamente 1,0 cm de comprimento foi feita, e as superfícies ósseas das tíbias foram expostas cirurgicamente por dissecação romba. Sob irrigação salina, as tíbias foram perfuradas bicorticalmente a uma velocidade rotativa não superior a 1.500 rpm. Um implante de titânio puro comercialmente disponível, com 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro, foi colocado até que as roscas do implante estivessem completamente incorporadas no córtex do osso (Figura 1). Por último, os tecidos moles foram

restituídos e suturados. No pós-operatório, os animais receberam antibiótico (Pentabiótico, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, SP, Brasil), dada como uma única injeção intramuscular (1 mL/kg).

5. DESENVOLVIMENTO

Após a colocação dos implantes, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos e foram submetidos à administração oral diária por gavagem de Resveratrol ou substância placebo até o sacrifício: Grupo Controle (N = 10) - administração da solução placebo por 30 dias e Grupo RESV (N = 10) - administração de 10 mg/kg de Resveratrol por 30 dias (Martin et al. 2004, Silva et al. 2007, van Ginkel et al. 2007, Schmatz et al. 2009). Uma solução stock de Resveratrol (R5010-500mg - Sigma-Aldrich Ltda, São Paulo, SP) (peso molecular, 228,2) foi preparada em etanol e em seguida diluído em água para concentrações de trabalho. A solução de placebo era composta de quantidades semelhantes de etanol e água utilizados durante a preparação do Resveratrol.

Depois de trinta dias de administração de Resveratrol e placebo, os animais foram sacrificados, a tíbia foi dissecada para expor o implante, permitindo a fixação de um medidor de contra-torque com um intervalo de escala de 0,1 - 10 N/cm e as divisões de 0,05 N/cm. Uma chave foi adaptada à cabeça do implante para aplicar um torque na direção inversa da colocação do implante. A rotação do implante foi executada até a ruptura completa da interface osso-implante. O valor da força de torque obtidos em N/cm foi considerado como o torque necessário para a decomposição de osseointegração (Spin-Neto et al. 2010, Guimarães et al. 2011).

6. RESULTADOS

A comparação intergrupos indicou que os valores médios de contra-torque foi significativamente mais elevados para a remoção do implante no Grupo RESV, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). A Figura 2 ilustra os valores das forças de contra-torque em cada grupo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Resveratrol é um polifenol que pode ser extraído a partir de determinadas plantas naturais, incluindo frutos, nozes, uvas ou industrialmente sintetizado (Singh et al. 2000, Athar et al. 2007). É reconhecido por exercer inúmeros benefícios para a saúde, incluindo atividade anti-câncer (quimiopreventiva), propriedades cardio e neuro-protetores e efeitos positivos no metabolismo ósseo (Breen et al. 2012, Li et al. 2012, Whitlock & Baek 2012).

A capacidade do Resveratrol em inibir os osteoclastos e induzir a formação óssea, fez com que ele se tornasse um agente terapêutico atraente com possível relevância para inúmeras patologias ósseas (Mizutani et al. 1998, Backesjo et al. 2006, Tseng et al. 2011). No entanto, não havia informações disponíveis até o

momento revelando que o uso de Resveratrol poderia contribuir para a reparação óssea ao redor dos implantes dentários.

Os resultados do presente estudo demonstrou que o uso crônico de Resveratrol proporcionou benefícios sobre a retenção de biomecânica de implantes de titânio em ratos, aumentando a força do contra-torque a ruptura da interface osso-implante ao redor dos implantes.

Embora seja a primeira investigação para avaliar o papel do Resveratrol na cicatrização óssea ao redor de implantes dentários, estudos anteriores já relataram efeitos positivos do Resveratrol na reparação óssea em diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* (Mizutani et al. 1998, Andreou et al. 2004, Liu et al. 2005, Backesjo et al. 2006, Tseng et al. 2011, Uysal et al. 2011).

Neste contexto, Uysal et al. (2011) demonstraram em um estudo com ratos que a aplicação local de Resveratrol durante as fases iniciais de sutura inter-pré-maxilar ortopedicamente expandida pode estimular a formação óssea e encurtar o período de retenção.

Além disso, o Resveratrol apresentou uma ação preventiva e terapêutica para a osteoporose, aumentando a densidade mineral óssea e epifisária com a diminuição da inibição do teor de cálcio em fêmur de ratas ovariectomizadas, que indica que este composto pode exercer um papel na proteção contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio (Liu et al 2005).

Curiosamente, em um modelo *in vitro* de células osteogênicas da medula óssea de ratos, também foi demonstrado que o Resveratrol pode reverter o efeito inibitório de ambos os arilos hidrocarbonetos presentes no fumo do cigarro, assim como em lipopolissacarídeo providos de *Porphyromonas gingivalis* presentes em células osteogênicas (Andreou et al. 2004).

Embora estas evidências indiquem o potencial terapêutico do Resveratrol quanto à neoformação óssea, ainda não foi completamente compreendido o mecanismo exato que essa substância estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos e ou inibe a atividade de osteoclastos. No entanto, têm sido sugeridas algumas hipóteses que poderiam explicar, pelo menos em partes, as vias de ação do Resveratrol no metabolismo ósseo.

Os efeitos osteoterápicos do Resveratrol foram revelados pela primeira vez por Mizutani et al. (1998) que indicaram o Resveratrol em dose dependente aumentou a síntese de DNA e a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos.

Backesjo et al. (2006) em um estudo mostraram que o Resveratrol epigeneticamente alterou a expressão de genes em células-tronco mesenquimais (CTMs) através da ativação de Sirtuin (Sirt) -1, um importante gene regulador intracelular com uma implicação positiva para regeneração óssea (Lee et al. 2011), o que ocasionou um aumento de diferenciação dos osteoblastos em culturas MSC (Backesjo et al. 2006). Recentemente, Tseng et al. (2011) investigaram o mecanismo molecular de como o Resveratrol pode modular o compromisso de genealogia humana CTMs a osteogênese. Os autores mostraram que o Resveratrol é capaz de regular a expressão de Runx2 e osteocalcina, biomarcadores essenciais envolvidos com propriedades osteoblásticas (Tseng et al. 2011).

Além disso, outro mecanismo que poderia levar a um impacto benéfico do Resveratrol sobre o metabolismo do osso está relacionado com a Sirt-1/core fator de ligação do complexo (cbfa)-1 (Shakibaei et al. 2011). O fator de transcrição osso cbfa-1 é o principal marcador da osteogênese, agindo como um ativador de transcrição e que pode induzir a expressão de genes específicos dos osteoblastos em fibroblastos e mioblastos em cultura (Ducy 2000). Tem sido demonstrado que Sirt-1 modula a presença de cbfa-1 e contribui para a manutenção do fenótipo do osteoblasto pela regulação direta deste fator de transcrição de osso (Shakibaei et al. 2011). Segundo os últimos autores, o tratamento com Resveratrol pode favorecer a formação de complexos Sirt-1/cbfa-1, regulando o equilíbrio entre a atividade osteoclástica contra osteoblástica, e influenciando positivamente a formação óssea in vitro.

Em conformidade com estas constatações, em outra investigação recente (Chen et al. 2012) foi verificado que a administração de Resveratrol diminuiu os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- α , uma citocina pró-inflamatória identificada como uma importante mediadora da reabsorção óssea (Hofbauer et al. 2000), impedindo a diminuição na densidade mineral óssea. Em conjunto, os mecanismos biológicos discutidos acima pode apoiar o potencial terapêutico do Resveratrol para estimular a cicatrização óssea e inibir a perda óssea, explicando parcialmente os resultados observados no presente estudo. No entanto, outros mecanismos de esta via devem ser esclarecidos.

Alguns aspectos importantes deste estudo devem ser considerados. Em primeiro lugar, os animais nesta pesquisa receberam doses diárias de Resveratrol somente após a colocação do implante. Recentemente, Halbold et al. (2011) revelou que o tratamento prévio com Resveratrol foi eficaz na prevenção contra a perda óssea tibial e femoral induzida por imobilização dos membros posteriores em ratos. Então, seria relevante investigar se a administração prévia de Resveratrol - durante um período antes da colocação do implante, além de administração após a cirurgia - pode alcançar resultados mais promissores em termos de cicatrização óssea do que a sua utilização somente após a inserção do implante. Além disso, embora os resultados de experimentos com animais não podem ser diretamente extrapolados para humanos, os dados do presente estudo revelam um papel positivo do Resveratrol sobre a retenção de biomecânica de implantes de titânio e, portanto, podem contribuir no desenvolvimento de uma nova estratégia para melhorar a sobrevivência dos implantes durante a reabilitação de pacientes totalmente ou parcialmente desdentados. No entanto, mais estudos devem ser considerados para investigar se o aumento da retenção biomecânica dos implantes, promovido pelo Resveratrol na presente investigação, é clinicamente relevante.

Sabe-se que algumas condições como a idade, certos estados de doença metabólica, ou intervenção farmacológica pode contribuir para a falha do implante, prejudicando a cicatrização do osso em torno de titânio implantes (Payne et al. 2000, Rapuri et al. 2000, Duarte et al. de 2005, Zupnik et al. 2011). Tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo devido ao papel favorável do Resveratrol sobre a retenção biomecânica de implantes, pode-se sugerir que

especialmente para pacientes nestas situações de risco, a utilização de Resveratrol, numa base diária durante períodos prolongados poderia ser uma estratégia clínica para aumentar as taxas de sucesso, melhorando o prognóstico de implantes de titânio em tais circunstâncias. Estudos adicionais são necessários para demonstrar se a administração contínua de Resveratrol poderia ser capaz de reverter os efeitos negativos promovidos por essas condições.

Em conclusão, dentro dos limites do presente estudo, foi demonstrado que a administração de Resveratrol melhorou a retenção biomecânica de implantes de titânio inseridos em ratos, sugerindo que a utilização crônica desta substância pode tornar-se um adjuvante útil na reabilitação de pacientes desdentados com implantes dentários.

8. FONTES CONSULTADAS

1. ANDREOU, V. et al. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol* 2004; 75:939-948.
2. ATHAR, M. et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:274-283.
3. BACKESJO, C.M. et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2006; 21:993–1002.
4. BHATT, S.R. et al. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 30:258-264.
5. BOISSY, P. et al. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005; 65:9943–9952.
6. BREEN, D.M. et al. Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2012; 222:375-381.
7. CHEN, L.L. et al. Effect of catch-up growth by various dietary patterns and resveratrol intervention on bone status. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237:297-304.
8. DAI, Z. et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 2007; 14:806–814.
9. DELLA-MORTE, D. et al. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* 2009; 159:993–1002.
10. DUARTE, P.M. et al. Age-related and surgically induced estrogen deficiencies may differently affect bone around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2005; 76:1496-1501.
11. DUCY, P. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000; 219:461–471.

12. GUIMARÃES, R.P. et al. Effects of induced diabetes and the administration of aminoguanidine in the biomechanical retention of implants: a study in rats. *J Periodontol Res* 2011; 46:691-696.

13. HABOLD, C. et al. Effect of prior treatment with resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. *J Bone Miner Metab* 2011; 29:15-22.

14. HOFBAUER, L.C. et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15:2-12.

15. LEE, S.M. et al. Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a nonobese mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011; 54:1136-1146.

16. LI, Z. et al. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res* 2012; 23:116-124.

17. LIU, Z.P. et al. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food* 2005; 8:14-19.

18. MARTIN, A.R. et al. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:1399-1410.

19. MIZUTANI, K. et al. Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:859-863.

20. PAYNE, J.B. et al. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. *J Clin Periodontol* 2000; 27:658-664.

21. RAPURI, P.B. et al. Smoking and bone metabolism in elderly women. *Bone* 2000; 27:429-436.

22. RIBEIRO, F.V. et al. Effect of aluminum oxide-blasted implant surface on the bone healing around implants in rats submitted to continuous administration of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24:226-233.

23. SCHMATZ, R. et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 21:42-48.

24. SHAKIBAEI, M. et al. Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J Biol Chem* 2011; 286:11492-11505.

25. SIGNORELLI, P. et al. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 2005; 16:449-466.

26. SIMONIS, P. et al. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:772-777.

27. SINGH S.U. et al. Inhibition of dioxina effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol* 2000; 167:183-195.30.

28. SOUFI, F.G. et al. Chronic resveratrol administration has beneficial effects in experimental model of type 2 diabetic rats. *Endocr Regul* 2012; 46:83-90.

29. SPIN-NETO, R. et al. Homeopathic *Symphytum officinale* increases removal torque and radiographic bone density around titanium implants in rats. *Homeopathy* 2010; 99:249-254.

30. TSENG, P.C. et al. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* 2011; 26:2552-2563.

31. UYSAL, T. et al. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded interpremaxillary suture: early bone changes. *Orthod Craniofac Res* 2011; 14:80-87.

32. VAN GINKEL, P.R. et al. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5162-5169.

33. WANG, Z. et al. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med* 2005; 16:533-540.

34. WHITLOCK, N.C. et al. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors. *Nutr Cancer* 2012; 64:493-502.

35. ZUPNIK, J. et al. Factors associated with dental implant survival: a 4-year retrospective analysis. *J Periodontol* 2011; 82:1390-1395.

ANEXOS

Figura 1

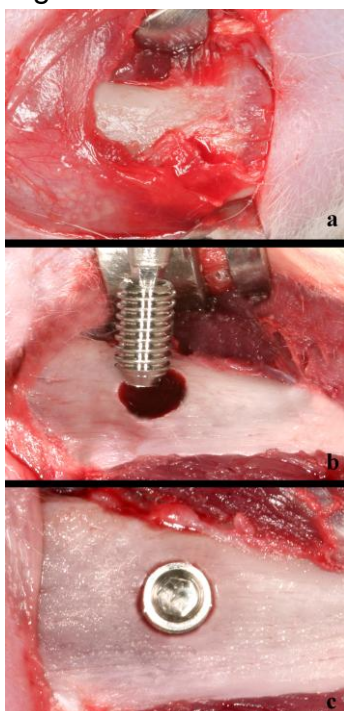
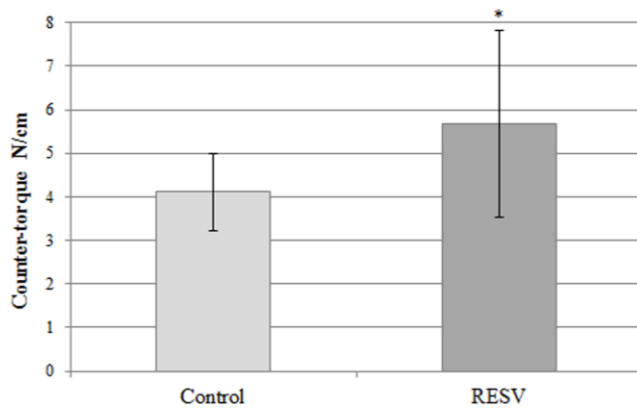


Figura 2



Legenda das imagens

Figura 1. a) exposição cirúrgica de superfícies ósseas da tíbia por dissecção romba. b) A inserção de implante de titânio em tíbias. c) O implante foi completamente colocado até que todas as roscas de parafuso fossem incorporadas no córtex do osso.

Figura 2. Gráficos que ilustram meios e desvios-padrão dos valores de contra-torque (N/cm) em ambos os grupos. * Diferença entre os grupos (Mann-Whitney, $p < 0,05$).