



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

JULIANA APARECIDA NAJARRO DEARO MORAIS

Efeito do *Diabetes Mellitus* e da insulino-terapia na
osseointegração estabelecida ao redor de implantes
instalados em tíbia de ratos.

Araraquara

2007



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

JULIANA APARECIDA NAJARRO DEARO MORAIS

Efeito do *Diabetes Mellitus* e da insulino-terapia na
osseointegração estabelecida ao redor de implantes
instalados em tíbia de ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Gulnara Scaf

Co-orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Araraquara

2007

JULIANA APARECIDA NAJARRO DEARO MORAIS

Efeito do Diabetes Mellitus e da insulino-terapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes instalados em tibia de ratos.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador : Profa. Dra. Gulnara Scaf

2º Examinador: Prof. Dr. Julio César Joly

3º Examinador: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo Rezende

4º Examinador: Prof. Dr. Guilherme Tosoni

5º Examinador: Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

Araraquara, 22 de Novembro de 2007

Dados Curriculares

Juliana Aparecida Najarro Dearo de Moraes

Nascimento: 08.12.1977 – Monte Santo de Minas - MG

Filiação: José Francisco de Moraes
Maria das Dores Najarro Dearo de Moraes

1996 - 1999 Curso de Graduação
Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas – MG

2000 - 2002 Curso de Especialização em Implantodontia
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP

2002 - 2004 Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2004 - 2007 Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho ...

... Aos meus pais

por tanta dedicação e carinho durante toda a minha vida e pela paciência durante esse período. Obrigada por cada mão que vocês estenderam nos meus momentos de desespero.

... À minha irmã

pelo companheirismo e cumplicidade.

... Ao meu noivo Euclides

pelo amor e paciência durante todo esse tempo e também pela ajuda para limpar os ratinhos e aplicar a insulina no carnaval.

Agradecimento especial ...

... A Deus

minha força maior, esperança e fé. Por ter me oferecido o que é bom: uma família digna, saúde e uma formação profissional. Agradeço-te senhor por tudo que tens feito na minha vida; por iluminar cada passo e pela segunda chance de viver.

Agradecimentos especiais...

... À minha orientadora Profa. Dra. Gulnara Scaf

por toda a dedicação, orientação e competência. Tentei aprender a ter disciplina. Esses cinco anos de convívio foram de muito aprendizado, e acho que cresci um pouquinho nesse universo acadêmico e devo a senhora. Professora, obrigada por tudo!

... Ao meu co-orientador Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

gostaria de agradecer a confiança e ajuda durante a pós-graduação. Admiro sua competência profissional e sua humanidade com seus alunos.

... À Profa. colaboradora Dra. Maria Teresa Pepato

pela dedicação e boa vontade para o delineamento desta pesquisa, pela confiança em abrir as portas do laboratório e do biotério. Certamente esta pesquisa não teria acontecido sem sua ativa colaboração na parte sistêmica.

... À Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo Rezende

obrigada por todos os ensinamentos concedidos durante a especialização e por ter oferecido a possibilidade de uma convivência maior. Você é para mim um exemplo de profissional, mãe, esposa e mulher. A você, ao Jeferson e as “crianças” minha sincera gratidão.

... À Profa. Dra. Ann Wenzel

pela contribuição na análise radiográfica e por ceder o programa de análise da subtração radiográfica digital.

Agradecimentos

Minha sincera gratidão aos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, pela dedicação e esforço empreendidos na administração deste curso.

Aos docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Côrrea de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, pela atenção, orientação e competência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, que concedeu bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro da parte radiográfica deste estudo.

Ao Programa Pós-graduação em Periodontia pelo apoio financeiro ao restante do estudo.

À empresa Titanium Fix e ao presidente Sr. Sidival Dias pela doação do implantes.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Cláudia, Maria do Rosário, Terezinha, Maria José, Cidinha, Thelma, Sueli e Toninho, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitou a realização desse trabalho.

À Regina Lúcia pela competência e administração nos seus trabalhos e à Claudinha pelos ensinamentos, execução e dedicação da parte histológica.

Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia de Araraquara, Marcos por todo ensinamento no cuidado dos animais e realização dos exames e Valéria no ensinamento na realização dos exames bioquímicos.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Radiologia, Profa. Gulnara, Prof. Marcelo, Prof. Guilherme, Profa. Andréia, Edineide e Marcos pela disponibilidade em utilizar a clínica e os aparelhos radiográficos.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Mara, Rosângela, Vera, Sílvia e Guilherme, pela paciência e competência no decorrer de todo o curso.

À todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca, Adriano, Ceres, Eliane, Eliane Scarso, Maria Aparecida, Maria Helena, Maria Inês, Maria José, Marley, Odete, Sandra e Sílvia pela colaboração e paciência.

Aos colegas do curso de Doutorado em Periodontia, Andréa, Beatriz, Daniela, Eduardo, Fernanda, Fernando, Ivy, Juliana Rico, Patrícia e Vanessa pelos momentos de convivência.

À Patrícia, Ivy e Bia por terem sido minhas amigas mais próximas durante o curso, por serem tão prestativas e colaboradoras, dentro e fora da Universidade.

Aos meus colegas Ivy, Rafael Faeda, Rafael Sartori e Celso Sakakura por participarem nas diversas etapas deste trabalho. Mas especialmente à Ivy porque nossas teses exigiram que nós convivêssemos integralmente juntas, e com isso passamos a dividir nossas alegrias, tristezas e fofocas (é lógico!). E o mais importante de tudo, nós chegamos parcialmente ao fim, certamente esse dia é de felicidade dupla. Ao Celso pelo ensinamento da subtração radiográfica e ao Rafael Faeda que me ajudou em várias fases da parte experimental: parte cirúrgica e sacrifício, no torque e no ensinamento do histológico.

Ao Mário e a Thalita, ex-alunos da iniciação científica, por terem colaborado arduamente na parte experimental, inclusive sábado e domingo. A escala de insulina, montagem da gaiola metabólica e limpeza dos animais era terrível só nos quatro é que sabemos. Desta forma eu agradeço a todos que me ajudaram na parte experimental.

Ao Rogério Margonar por passar todo conhecimento prévio em relação a esta metodologia.

À todos os colegas do Curso do Doutorado e Mestrado, atuais e passados, pela amizade e por alertar em relação às dificuldades futuras.

À Prof. Dr. Sílvio Govone, pela orientação da estatística.

À minha família que contribuiu nessa tese: Tia Vilma Benito que realizou a correção do português, à Fátima e minha irmã por terem me ajudado a fazer os cálculos bioquímicos e de densidade e ao meu pai que foi motorista várias vezes.

À toda minha família, tios, tias e primos pelos momentos importantes de convivência.

À minha nova e futura família, obrigada por entenderem a minha constante ausência.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1 Introdução	18
2 Revisão da Literatura	22
2.1 Implantes dentários.....	23
2.2 Diabetes Mellitus	27
2.3 Métodos radiográficos	49
3 Proposição	64
4 Material e Método	66
4.1 Estudo piloto	67
4.2 Amostra	68
4.3 Procedimento cirúrgico	71
4.4 Indução de diabetes	74
4.5 Controle glicêmico	75
4.6 Administração de insulina	76
4.7 Obtenção da imagem radiográfica	80
4.8 Análise radiográfica	82
4.9 Análise do torque de remoção do implante	84
4.10 Análise bioquímica	85
4.11 Análise histométrica	91
4.12 Análise estatística.....	93
5 Resultado	95
5.1 Resultados da primeira parte	96
5.2 Resultados da segunda parte	118
6 Discussão	121
7 Conclusão	138
8 Referências	140
9 Anexos.....	161

Resumo

Morais JAND. Efeito do Diabetes Mellitus e da insulino-terapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes instalados em tibia de ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma alteração metabólica que pode comprometer a estabilidade do implante dentário devido a influência no tecido ósseo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do Diabetes Mellitus e da insulino-terapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes instalados em tibia de ratos. Foram utilizados 80 ratos Wistar, os quais foram divididos em 4 grupos: controle de 2 meses (C2m), controle de 4 meses (C4m), diabético (D) e insulínico (I). Os implantes de superfície lisa (2,2mmx4mm) foram instalados na tibia do rato. Após um período de 2 meses para osseointegração, o grupo C2m foi sacrificado. A indução do DM foi realizada com dose única de estreptozotocina (40mg/Kg) pela veia peniana. Os ratos do grupo I receberam insulina subcutânea (8,5 U/dia) e os demais receberam solução salina (0,9%) pela mesma via. Os níveis da glicemia plasmática foram avaliados periodicamente pelo método enzimático da glicose-oxidase. Dois meses após a indução do DM, os grupos C4m, D e I foram sacrificados. A relação do tecido ósseo com o implante foi

avaliada pelas análises: radiográfica (subtração radiográfica digital); bioquímica; histométrica e torque de remoção do implante. Os dados das análises radiográfica, bioquímica e histométrica foram comparados nos grupos pelo teste ANOVA, $p > 0,05$. Os dados da análise do torque de remoção foram comparados nos grupos pelo teste Kruskal Wallis e Friedman, $p > 0,05$. Os resultados mostraram que o grupo D apresentou níveis de glicemia plasmática acima de 300mg/dL e significativamente mais alto do que os grupos C4m e I após a indução do DM e esta condição sistêmica foi mantida até o final do experimento. Os resultados bioquímicos evidenciaram um aumento significativo da determinação plasmática de fosfatase alcalina e da excreção urinária de cálcio do grupo D após a indução do DM. Os resultados da subtração radiográfica digital determinaram que o grupo D foi estatisticamente inferior em relação ao grupo insulínico nos valores de ganho de nível de cinza. Os resultados histométricos da área óssea determinaram que o grupo D (69,34±5) apresentou diferença estatística significante em relação aos grupos C4m (78,2±5,5) e I (79,63±5,27). O torque de remoção no grupo D (12,9±2,5) foi estatisticamente inferior ao grupo I (17,1±3) ($p < 0,05$), porém sem diferenças significantes com os grupos C2m (13,1±2,6) e C4m (16,9±5,3). A indução experimental do DM parece prejudicar a osseointegração de implantes devido apresentar uma tendência negativa nos resultados em relação à densidade óssea radiográfica na subtração digital, ao contato entre osso e implante e à área óssea, ao torque para remoção do implante além de apresentar elevados valores de componentes ósseos bioquímicos relacionados à perda óssea. A insulino-terapia evitou a ocorrência das alterações ósseas detectadas em animais diabéticos.

Palavras chaves: Diabetes Mellitus; implante dentário; radiologia.

Abstract

Morais, JAND. Effect of Diabetes Mellitus and insulin therapy on osseointegration around dental implants installed in tibiae of rats [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

The Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease that can impair the dental implant establishment by bone tissue influence. The aim of this study was evaluate the effect of Diabetes Mellitus (DM) and insulin therapy on osseointegration around dental implants. Eighty implants were placed in 80 tibiae of adult rats. After a healing period of two months, the animals were divided into four groups of 20 animals each and subdivided into 10 rats for removal torque analysis and 10 rats for histometric analysis. Group C2m was sacrificed at this time. DM was induced using 40mg/kg Streptozotocin in a diabetic group (group D) and an insulinic group (group I). During two months, group I received subcutaneous doses of 8.5 UI insulin twice a day. Groups C4m (control of 4months) and D received only saline. After two months, the animals of groups D, I and C4m were sacrificed. The glycemc control of the animals was monitored during the experiment. The relation of bone with implant was evaluated by

radiographic (digital subtraction radiography), bioquimic, histometric and removal torque analysis. Data obtained with radiographic, bioquimic and histometric analysis were analyzed and compared by ANOVA test, $p > 0,05$. Data obtained with removal torque analysis were analyzed and compared by Kruskal Wallis and Friedman tests, $p > 0,05$. The glycemic controls were within normal range for groups A, C and I and higher for group D and maintained during experiment. Greater significant values of ALP serum and Ca urinary were determined in group D after DM induction. There was a significant difference in gray shade values in the subtraction image between groups D (123 ± 9) and I (136 ± 5) ($p < 0,05$) on bone formation around the implant while there were no significant differences between control groups A (127 ± 13) and C (133 ± 10) and insulinic group. The histometric analysis about bone volume determined that group D (69.34 ± 5) showed significant difference in relation to groups C4m (78.2 ± 5.5) and e I (79.63 ± 5.27). In torque reverse analysis, group D (12.9 ± 2.5) was statistically lower than g (17.1 ± 3) ($p < 0,05$), but without significant differences with groups ----- (13.1 ± 2.6) and C4m (16.9 ± 5.3). In conclusion, Diabetes Mellitus appear to impair the osseointegration of dental implants because the results presented a negative tendency on density bone in SRD values, on volume bone and bone-implant contact values, on reverse torque values. Besides, high values of bone bioquimic components relationed with bone loss were showed in DM. The insulin therapy was able to avoid the occurrence of bone alterations observed in diabetic animals.

Keywords: Diabetes Mellitus; dental implant; radiology.

1 Introdução

A implantodontia é uma opção de tratamento na reabilitação funcional e estética de pacientes parcial ou totalmente edêntulos^{3,8,46}.

A condição de saúde geral e bucal do paciente é um dos aspectos a ser avaliado previamente à indicação do tratamento^{3,29,46}. Dentre as alterações do estado geral de saúde, destaca-se o *Diabetes Mellitus* (DM), o qual apresenta uma variação patológica no metabolismo da glicose. A hiperglicemia pode ser causada pela deficiência na produção de insulina e/ou uma alteração na sensibilidade celular à insulina podendo ocasionar complicações sistêmicas como miopatias, doenças macrovasculares e fatores que comprometem o processo de cicatrização, assim como a formação e a remodelação óssea^{23,29,34,46}.

Considerando a instalação de implantes em pacientes diabéticos, há opiniões controversas na literatura^{24,42}. Estudos experimentais em animais mostram que o DM pode interferir negativamente na cicatrização óssea ao redor de implantes, devido a ocorrência de uma formação óssea reduzida e lenta, menor contato entre o osso e o implante e o osso neoformado apresenta-se imaturo e menos organizado^{42,49,58}. Por outro lado, Nevins et al.⁵⁸ (1998) descreveram ausência de falha nos implantes e infecções durante o experimento determinando o estabelecimento da osseointegração mesmo na presença do DM. Os resultados

de McCracken et al.⁵¹ em 2000 e McCracken et al.⁵² em 2006 apresentaram maior volume ósseo ao redor de implantes em ratos diabéticos em relação aos ratos insulínicos e controles, porém o osso era menos organizado. Além disso, estudos clínicos demonstraram taxas de sucesso moderadas de implantes em pacientes diabéticos com níveis de glicose controlados^{2,5-6,22-23}, porém alguns desses estudos foram realizados em pacientes que receberam implantes entre os forames mentuais, área de melhor qualidade óssea^{5,63,66}.

Um outro aspecto encontrado na literatura é a influência da insulino terapia na osseointegração. Há estudos que reportaram a capacidade da insulina em regular e reduzir os efeitos do DM na cicatrização óssea^{24,49,82} apresentando maior formação óssea^{24,82} e outros estudos mostraram significativamente menos contato osso-implante nos animais tratados com insulina em comparação a animais sem doença^{24,49}. Finalmente, a manutenção da osseointegração por um longo período é outro importante aspecto que deve ser avaliado em diabéticos. Somente um estudo foi encontrado na literatura sobre esta condição e os resultados indicaram a redução do contato osso-implante em um período de quatro meses em ratos diabéticos e nos ratos tratados com insulina a porcentagem de contato osso-implante medular foi mantida⁴³, porém este aspecto não foi analisado em animais sem o DM. Além disso, mais estudos precisam elucidar a influência do DM e da insulino terapia nos implantes dentais já osseointegrados.

A radiografia é um exame complementar no planejamento e preservação dos implantes, pois oferece informações adicionais ao exame clínico

sobre o tecido ósseo. A subtração radiográfica digital (SRD) é um método de análise radiográfica desenvolvido para ser utilizado na detecção de sutis alterações ósseas em relação à densidade e à área entre duas tomadas radiográficas do mesmo objeto em períodos diferentes de tempo³¹. A técnica da subtração requer que as duas radiografias apresentem semelhanças em relação aos fatores geométricos e aos parâmetros de contraste e densidade⁹⁹. A SRD tem apresentado melhores resultados do que radiografias convencionais em estudos com espécimes macerados, experimentais em animais e clínicos^{16,31,38,61,99}. Na Implantodontia, a SRD pode oferecer informações sobre o processo de cicatrização, a influência de doenças e tratamentos na osseointegração e o diagnóstico e acompanhamento da periimplantite.

Considerando a importância de avaliar prováveis modificações na quantidade e qualidade óssea do leito receptor de implantes dentais já osseointegrados, sob a influência do *Diabetes Mellitus* e da insulinoterapia é que foi proposto este estudo.

2 Revisão da Literatura

2.1 Implantes dentários

2.1.1 Conceito

O sucesso dos implantes dentários está diretamente relacionado com o princípio de osseointegração, que foi definido como o “contato direto entre osso e implante em função, sem interposição de qualquer outro tecido”⁸.

A cicatrização óssea ao redor de implantes dentais é dependente de uma série de fatores. O tempo tem sido descrito como um fator importante, uma vez que se observa um crescimento progressivo do osso entre as espiras do implante e um aumento da porcentagem de tecido ósseo em contato direto com a sua superfície. Testes biomecânicos têm comprovado este fenômeno, já que a força necessária para desrosquear o implante aumenta gradualmente com o passar do tempo⁴⁶. Os estudos em ratos avaliando osseointegração têm estabelecido entre 28 e 56 dias como períodos longos de acompanhamento dos animais, após esse período os parâmetros não aumentam de forma significativa^{24,82}.

Um outro aspecto fundamental para o sucesso dos implantes dentais é a avaliação das condições de saúde geral e bucal do paciente, as quais têm sido extensivamente estudadas^{3,29,46}. Não foram encontrados trabalhos na literatura que comprovem cientificamente contra-indicações para a colocação de

implantes dentais, em pacientes com alterações sistêmicas. No entanto, como diversas alterações sistêmicas podem influenciar na progressão da doença periodontal⁵³, fatores como fumo, discrasias sangüíneas, osteoporose, radioterapia, alterações psicológicas, alcoolismo e *Diabetes Mellitus* (DM) não controlada vêm sendo apontadas como contra-indicações relativas, podendo resultar em uma taxa de sucesso reduzida na reabilitação com implantes dentários¹⁴.

2.1.2 Avaliação da osseointegração

Em pacientes, Albrektsson et al.⁴ (1986) propuseram um índice de sucesso no qual é analisada a mobilidade dos implantes individualmente; ausência de radiolucidez periimplantar; ausência de sinais e sintomas persistentes ou irreversíveis como dor, desconforto, alterações sensoriais ou infecção atribuída ao implante; perda da crista óssea marginal menor que 0,2mm por ano e 1mm após o primeiro ano do implante em função. Portanto, para avaliação dos implantes é imprescindível à realização do exame radiográfico nas consultas de retorno do paciente, sendo de extrema importância para a Implantodontia determinar métodos eficientes e sensíveis para detecção de alterações ósseas.

Entretanto, o entendimento do processo de osseointegração precisa ser realizado em estudos experimentais em animais. Brånemark et al.⁸ (1969) foram os primeiros autores a relatar a osseointegração, obtida em cães, os quais tiveram os dentes extraídos e posteriormente receberam implantes de titânio. Após a cicatrização por 3 a 4 meses, os implantes receberam próteses e as análises

radiográficas e histológicas indicaram estabilidade dos implantes sendo estes capazes de suportar 100kg de carga na mandíbula e 30kg a 50kg na maxila. Além disso, os autores relataram que ao tentar separar os implantes do osso ocorria fratura óssea, mas a interface osso-implante permanecia intacta. Em estudos experimentais é possível utilizar métodos eficazes para acompanhar o processo de osseointegração.

Um deles é a avaliação da interface osso-implante por meio do método histológico apresentado por Donath, Breuner²⁰ (1982). Este método consiste no corte e desgaste de peças histológicas contendo osso, dentes, implantes cerâmicos e metálicos sem a necessidade de descalcificação da peça histológica, previamente ao corte, e oferecendo lâminas histológicas com espessuras de 5µm a 50µm. A análise da interface osso-implante por meio de cortes não descalcificados tornou-se o padrão ouro para avaliação da osseointegração em implantes dentários. O método permitiu a inserção de duas análises quantitativas na avaliação histológica: o contato osso-implante e a área de formação óssea entre as espiras do implante. Com essa análise histológica, a osseointegração pode ser definida como a porção do tecido ósseo em contato com o metal do implante. Entretanto, uma desvantagem do método é que poucas lâminas histológicas, geralmente 1 ou 2, de cada peça são disponibilizadas para análise, dependendo do tamanho da peça. Em estudos utilizando miniimplantes em ratos, normalmente, uma lâmina histológica é obtida. Além disso, artefatos de técnica podem determinar áreas do metal que não estão em contato com o osso, mas também não apresentaram nenhum tipo de tecido mole interposto. Mas é

considerada uma superfície osseointegrada, em virtude desse espaço ter sido originado pela contração da peça durante o processo de desidratação ou de polimerização de resina²⁰.

A análise histológica é encontrada com diferentes critérios na literatura: 1- as três ou quatro melhores espiras consecutivas para inclusão da análise histomorfométrica^{11,21,67,85}; 2- uma espira da região cortical⁴⁸; 3- todas as espiras do implante analisadas totalmente¹⁵; 4- todas as espiras do implante analisadas de forma segmentada (cortical e medular)²¹. Cada critério de análise apresenta sua especificidade e como esses estudos são realizados geralmente em ossos longos dos animais, há a presença do osso cortical e da medula óssea. A análise restrita da cortical reduz a variabilidade dos resultados. Já a análise integral das espiras dos implantes oferece valores mais baixos dos parâmetros histológicos de contato osso-implante e da formação óssea e maior variabilidade dos resultados. Porém, a análise de todo o implante de forma segmentada parece ser mais coerente, uma vez que o tipo de osso, cortical ou medular, apresenta diferença na velocidade do metabolismo.

Um outro parâmetro utilizado para avaliar a osseointegração é a mensuração do torque necessário para remover o implante que está supostamente osseointegrado. Este teste foi introduzido por Carlsson et al.¹¹ (1989) e consiste na adaptação de um torquímetro ao implante para mensurar a força mínima necessária para remover o implante do leito ósseo, ou seja, a resistência da osseointegração. Assim, esse método tem sido utilizado para avaliar o

comportamento de diferentes superfícies^{15,21}, bem como os efeitos das alterações sistêmicas na osseointegração^{49,73}.

Além disso, há pesquisadores utilizando programas de análise radiográfica, como a subtração radiográfica digital, para avaliar a densidade óssea ao redor de implantes. A SRD consiste na detecção de pequenas alterações ósseas. Assim, estudos em implantodontia têm apresentado resultados significativos na avaliação do efeito de fármacos na osseointegração⁷¹ e preservação do tratamento da periimplantite⁷⁶. Considerando esses resultados e os somando à vantagem do método radiográfico ser uma técnica não invasiva de análise, avaliar os métodos radiográficos e os métodos de avaliação da osseointegração conhecidos na literatura em estudos experimentais, como o histológico e o biomecânico, é uma forma de enriquecer cientificamente o conhecimento sobre o assunto e proporcionar um melhor atendimento de pacientes reabilitados com implantes dentários na clínica odontológica.

2.2 Diabetes Mellitus

Um dos processos metabólicos do organismo é a conversão de alimentos em energia e calor dentro do corpo. O carboidrato é a principal fonte de glicose para as células, mas entre as refeições o fígado libera glicose estocada na forma de glicogênio para a corrente sanguínea. Para a glicose penetrar em cada célula do corpo é necessário que haja insulina circulante, produzida pelo pâncreas. Quando a glicemia aumenta após uma refeição, a quantidade de insulina também aumenta para que o excesso de glicose possa ser rapidamente absorvido pelas

células. Neste momento, o fígado cessa a degradação do glicogênio e passa a armazenar a glicose presente no sangue. A insulina é degradada após sua ação, portanto, o organismo renova a insulina utilizada no metabolismo da glicose a cada processo^{18,83}.

Quando há um distúrbio na produção de insulina ou uma alteração na sensibilidade celular à insulina ocorre uma alteração patológica na regulação do metabolismo da glicose (hiperglicemia) determinando o diagnóstico de um distúrbio metabólico chamado *Diabetes Mellitus* (DM)^{42,54}. Na última década o DM afetou 140 milhões de indivíduos no mundo e estima-se que 220 milhões sejam portadores em 2010⁵⁴. E aproximadamente 10 milhões de indivíduos são portadores do DM no Brasil⁸⁴.

O DM é classificado em dois tipos: tipo 1 e tipo 2. No diabetes tipo 1, as células do pâncreas são incapazes de produzir o hormônio da insulina. Se não há insulina circulando pelo corpo em concentrações ideais, a absorção de glicose fica prejudicada. Desse modo as células não são supridas pela glicose e o nível de glicose circulante fica elevado. A solução é injetar insulina subcutânea para que possa ser absorvida pelo sangue. Fatores hereditários parecem ter um papel importante, mas o distúrbio, em geral, nunca é diretamente herdado. O DM tipo 1 é caracterizado por hipercalciúria, hipomagnesemia e osteopenia⁹⁴. No diabetes tipo 2 as células do pâncreas são capazes de produzir insulina e mantêm esta função durante toda a vida do paciente. O principal motivo que faz os níveis de glicose no sangue permanecerem altos é a incapacidade das células musculares e adiposas de utilizarem toda a insulina secretada pelo pâncreas. Assim, a glicose

presente no sangue é pouco aproveitada por essas células. Os sintomas do diabetes tipo 2 são menos pronunciados, mas deve ser tratado com extrema cautela, pois é uma patologia que pode por em risco a saúde do indivíduo^{18,84}.

O tratamento não adequado do DM pode ocasionar complicações sistêmicas como miopatias, retinopatias, doenças macrovasculares e fatores microvasculares que comprometem o processo de cicatrização, assim como a formação e a remodelação óssea^{23,29,34,49}.

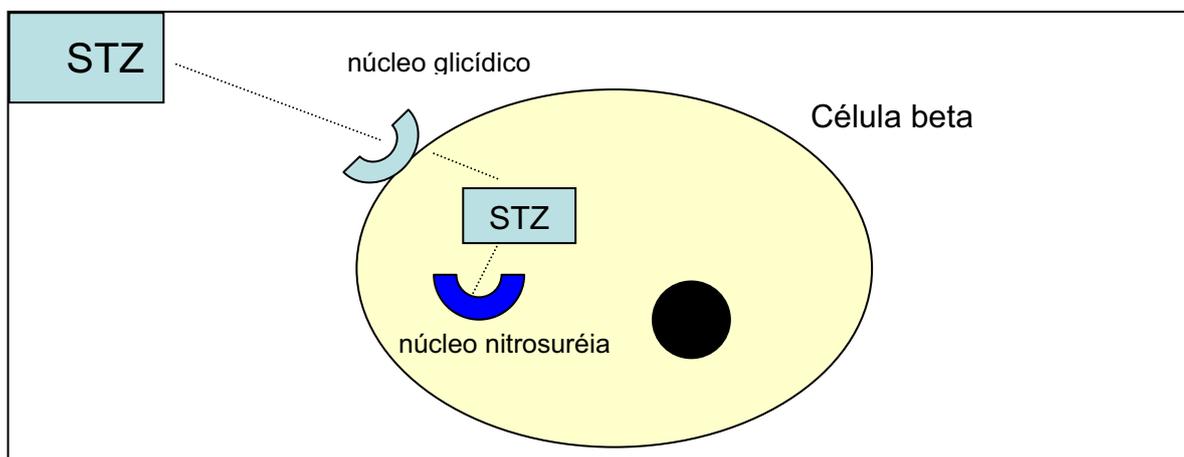
Ainda considerando as alterações microvasculares nos pacientes diabéticos, eles têm um pobre potencial de cicatrização nos tecidos mole e duro (ósseo), devido à redução do metabolismo de proteínas e à função neutrofilica prejudicada⁶³. A insulinoopenia causa alterações no hormônio da paratireóide, no metabolismo da vitamina D e na absorção do cálcio⁸⁰. A perda óssea não está vinculada apenas a um aumento da atividade osteoclástica. A hiperglicemia inibe a diferenciação osteoblástica e altera a resposta do hormônio da paratireóide que regula o metabolismo do fósforo e do cálcio⁷⁴ e produz um efeito deletério na matriz óssea afetando a aderência, o crescimento e acúmulo de matriz extracelular⁹⁵.

2.2.1 Diabetes experimental

O pâncreas é constituído pelas ilhotas de Langerhans compostas por células α produtoras de glucagon, células β produtoras de insulina, células δ produtoras de somatostatina e células PP produtoras de polipeptídeo pancreático. As ilhotas pancreáticas podem sofrer alterações funcionais e morfológicas,

decorrentes de vários fatores. Existem fármacos (aloxana e estreptozotocina) capazes de produzirem radicais livres que destroem as células β do pâncreas induzindo um DM tipo 1⁴⁴.

Deste modo, para possibilitar a análise experimental do *Diabetes Mellitus* em animais, um dos métodos utilizados para indução consiste na administração do antibiótico estreptozotocina (STZ), que causa a degranulação das células produtoras de insulina e, conseqüentemente, promove o aparecimento do diabetes. A droga age da seguinte maneira: o núcleo glicídico, presente na estrutura das células β , permite a entrada da STZ e o grupo nitrosúreia, também presente na célula, promove o acúmulo de substâncias tóxicas e conseqüente morte da célula em questão⁵⁶. A seguir, é apresentado um esquema ilustrativo da ação da estreptozotocina na célula beta do pâncreas.



Esquema criado a partir das informações do artigo de Murata et al.⁵⁶, 1999.

A morfologia do pâncreas endócrino após a administração de STZ tem mostrado o aumento do número de células α e δ e aumento dos níveis plasmáticos de glucagon e somatostatina em detrimento a ausência de células β , porém esse quadro pode ser revertido porque as células β são capazes de diferenciação ou proliferação com o passar do tempo⁴⁴.

A indução do DM pela STZ pode ser constatada em 24h. As alterações fisiológicas manifestadas são: hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, polifagia e poliúria. A hiperglicemia plasmática aumenta a absorção de glicose pelos néfrons dos rins levando a um aumento da excreção de glicose na urina (glicosúria), gerando um aumento da pressão osmótica e maior retenção de água na urina (poliúria); conseqüentemente a ingestão de água é aumentada (polidipsia). O aumento do consumo de ração (polifagia) pode ser associado com o fato da ausência de insulina comprometer o transporte de glicose para as células, sendo assim as células ficam sem energia, portanto o animal aumenta a ingestão de ração para suprir a falta de energia celular e mesmo assim ocorre a perda de peso¹⁰⁰.

Em relação à influência do DM experimental no osso, baixas taxas de formação de nova matriz óssea podem ser explicadas pela redução do número de osteoblastos⁸⁰ ou pela redução da atividade dos osteoblastos. No início da doença, a redução da formação óssea em diabéticos está mais relacionada com o menor número de osteoblastos, os quais continuam funcionando normalmente. Nos animais diabéticos, uma relação normal e diretamente proporcional é observada entre os eventos de formação da matriz óssea e de mineralização óssea.

Porém, ao longo do tempo, a menor produção de matriz óssea mineralizada devido ao menor número de osteoblastos presentes no osso gera distúrbios na atividade dos osteoblastos, fato observado nas alterações das taxas da síntese da matriz do colágeno e/ou da mineralização óssea²⁸.

Goodman, Hori²⁸ (1984) concluíram que a formação e aposição da matriz óssea foram reduzidas em 50% nos ratos diabéticos em relação ao controle e que a insulina recuperou esta condição. A largura e a área de matriz osteóide foram similares entre os grupos diabético e insulínico e os dois grupos foram inferiores ao grupo controle. A mineralização óssea nos ratos diabéticos não foi prejudicada, ou seja, a matriz óssea neoformada foi mineralizada. As determinações bioquímicas não apresentaram correlação com os resultados histológicos. Os autores observaram uma heterogeneidade dos resultados no osso de animais diabéticos e concluíram que a formação óssea e o volume ósseo são prejudicados na presença do DM, fatos que suportam a hipótese que no diabetes o *turnover* ósseo é mais lento.

Outros fatores como baixa circulação dos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25 dihidróxi-vitamina D3), hipercalciúria, hipercortisolemia e redução dos níveis do hormônio paratireóide também foram observados e associados com as anormalidades ósseas presentes nos ratos diabéticos^{79,94}. A disfunção renal demonstrada por hipercalciúria, baixa regulação da expressão extracelular da proteína CaR (receptor sensível de cálcio/cátion polivalente) e alta regulação da NCCT (co-transportador de NaCl sensível a tiazida, relacionada com a captação

de Na^+ que é inversamente proporcional a excreção de Ca^{2+}) são observadas no DM experimental e associadas a osteopenia⁹⁴.

Reforçando as afirmativas anteriores, o trabalho de Shires et al.⁸⁰ (1981) evidenciou que o metabolismo ósseo nos ratos diabéticos é afetado pelo DM e não só por uma privação de nutrientes (grupo sem doença e com restrição de ração), porque os marcadores bioquímicos foram diferentes nos dois grupos, no diabetes foi observado maior concentração de fosfatase alcalina esquelética e perda de cálcio urinário.

Após a introdução dos implantes dentários como forma de tratamento de pacientes edêntulos, inclusive debilitados sistemicamente, se fez necessário compreender o mecanismo da formação óssea ao redor dos implantes. Por isso, a seguir serão apresentados estudos experimentais, em animais e em humanos, com o objetivo de avaliar o impacto do DM na osseointegração.

2.2.2 Estudos em animais

As taxas de sucesso e fracasso de implantes em pacientes têm sido avaliadas, mas somente estudos em animais tem mostrado o efeito biológico do diabetes e da insulinoaterapia na osseointegração de implantes. Em geral, os estudos experimentais do efeito do DM têm revelado uma alteração nos processos de remodelação e mineralização óssea. Há comprovações científicas que mostram uma quantidade de osso neoformado semelhante ou inferior no animal diabético em relação ao animal sem doença, porém há uma redução no contato osso-

implante, fato que pode confirmar o comprometimento da osseointegração em animais diabéticos^{42,54}.

De acordo com o tipo de osso (cortical ou medular) e a variação da qualidade óssea no leito receptor pode-se esperar uma velocidade diferente dos efeitos negativos do diabetes experimental no padrão de osseointegração. Takeshita et al.⁸⁷ (1997) mostraram no grupo controle células semelhantes a osteoblastos e osso ao redor do implante, já no grupo diabético demonstrou que havia células semelhantes a fibroblastos presentes em áreas com pouco tecido ósseo. No osso medular do grupo controle, foi observado maior contato entre osso-implante e maior área de tecido ósseo. Os efeitos do DM parecem atuar de forma mais rápida no osso medular. Reforçando esses resultados, Iyama et al.³⁶ (1997) avaliaram histologicamente implantes de titânio recobertos por hidroxiapatita em ratos diabéticos e sem doença. No grupo controle a formação óssea ocorreu ao redor de implantes, próximo ao endóstio e ao perióstio e no grupo diabético a densidade óssea foi menor no período de 21 dias. Esses resultados são indicativos que a partir de 21 dias do DM, a formação óssea ao redor de implantes fica comprometida pela doença, principalmente na porção medular.

Nevins et al.⁵⁸ (1998) avaliaram a osseointegração de implantes (2mm X 1mm) instalados 10 dias após a indução do DM (70mg STZ/Kg – via intraperitoneal) em ratos nos períodos de 28 e 56 dias. Os animais com glicemia superior a 350mg/dL foram considerados diabéticos. Os resultados histométricos indicaram que a quantidade de osso formado foi similar para animais controle e

diabético ($p>0,05$). Entretanto menos contato entre osso e implante foi determinado nos animais diabéticos quando comparado aos animais controles nos dois períodos analisados. ($p<0,0001$). Este estudo demonstrou que o processo de osseointegração é afetado pelo DM induzido por STZ. Esses resultados foram comprovados também por Giglio et al.²⁷ (2000) ao avaliarem a osseointegração de implantes laminados instalados em ratos diabéticos e comparado com ratos saudáveis em dois períodos (14 e 30 dias) determinaram que o osso, no grupo diabético, era menos mineralizado do que no grupo controle, no período de 14 dias, sendo este fato evidenciado no período de 30 dias. Além disso, a avaliação histométrica mostrou menor porcentagem de área óssea neoformada no grupo diabético em comparação com o controle. Considerando a diferença entre os períodos, o grupo diabético teve menor área óssea neoformada em 30 dias do que em 14 dias. Com esses dados, é possível dizer que o DM atrasa a cicatrização óssea.

O estudo de Ottoni, Chopard⁶² (2004) quantificou durante 8 semanas a neoformação óssea, no fêmur de ratos *Wistar* diabéticos. Implantes foram instalados nos animais pertencentes aos grupos controle e diabético. O osso neoformado nas regiões cortical e do perióstio, próximo ao implante, não diferiram entre os grupos. Entretanto, houve diferença significativa na neoformação óssea total no canal medular e na área de contato osso-implante na porção medular. Também nesse estudo, o período de maior atividade osteogênica foi determinado no começo da quarta semana e no final da quinta semana. Depósitos ósseos aderidos à superfície dos implantes demonstraram que os implantes são biocompatíveis e capazes de osseointegrar.

McCraken et al.⁵¹ (2000) avaliaram o efeito do DM na cicatrização de implantes, para isso, foram instalados implantes em 32 ratos após o DM ser induzido em 16 animais (65 mgSTZ/kg) e outros 16 animais serviram como controle em um período de 14 dias. Foram realizadas análises bioquímicas (glicose, fosfatase alcalina e osteocalcina) e histométricas (porcentagem de osseointegração, área óssea e frequência de contato). Os animais diabéticos apresentaram um total de osseointegração de 16,2% significativamente menor que os animais controle (24,5%). Porém, a porcentagem de área óssea neoformada foi 4 vezes maior no grupo diabético (25%) em relação ao controle(6,2%). As análises bioquímicas determinaram maior taxa de fosfatase alcalina no grupo diabético em relação ao grupo controle. Novamente, McCraken et al.⁵² (2006) reforçaram seus resultados anteriores em um estudo avaliando a área óssea ao redor de implantes em ratos diabéticos e ratos insulínicos. A amostra foi de 152 ratos divididos em três grupos: controle, diabético e insulínico em quatro períodos: 2, 7, 14 e 24 dias. A indução do DM foi com STZ 65mg/Kg via parenteral, considerando como diabético o valor de glicemia \geq 300mg/dL. Nos ratos insulínicos foi introduzido um dispositivo com liberação lenta de insulina. Três dias após a indução, implantes com superfície usinada (1.5mmX8mm) foram instalados na tíbia e a área óssea foi determinada após o sacrifício. Os resultados mostraram que o tempo influenciou positivamente na osseointegração, porém sete dias foi o período que apresentou maior área óssea em todos os grupos. O grupo diabético mostrou maior área óssea do que os grupos controle e insulínico, mas a análise descritiva determinou que o osso no diabético era menos organizado.

Além disso, o grupo insulínico teve um comportamento intermediário entre o controle e o diabético. Os autores sugerem que esse aumento maior de volume ósseo no diabético seja por efeito das AGES (*advanced glycation end-product*) interagindo com as proteínas, causando alteração no metabolismo ósseo podendo às vezes inibir a atividade osteoclástica. No grupo insulínico existe a regulação do nível glicêmico, então as alterações ósseas poderiam ser influenciadas por outros fatores. Talvez as alterações sejam provenientes da indução do DM pela STZ, já que Siqueira et al.⁸² (2003) mostraram resultados entre insulina e controle iguais e os animais haviam sido induzidos com aloxana. Outro fato observado neste estudo foi a maior área óssea na região do osso proximal ao implante do que na região distal, fato que poderia ser explicado pela presença de maior irrigação sangüínea, maior quantidade de células mesenquimais indiferenciadas e maior proximidade da epífise óssea (área de maior formação óssea em ossos longos).

2.2.3 *Estudos em humanos*

De acordo com o trabalho de Mellado-Vallero et al.⁵⁴ (2007), o consenso estabelecido no *World Workshop in Periodontics* (1996) em relação à terapia de implantes em diabético foi que “há uma ausência de evidências que a instalação de implantes em um paciente com *Diabetes Mellitus* controlado é um fator de risco maior que na população em geral”, mas o *National Institute of Health Consensus Development Conference Statement on Dental Implants* em 1998 determinou que “nenhum paciente diabético sem controle glicêmico rigoroso deve ser considerado paciente para cirurgia de implantes”. Portanto, o DM é

classificado como uma contra-indicação relativa para o tratamento com implantes⁵⁴.

Estudos em humanos^{29,60,66,68} têm avaliado a instalação de implantes osseointegráveis em diabéticos. Há estudos que demonstram índices de sucesso elevado em diabéticos controlados, porém a maior parte desses estudos foi realizada em pacientes que receberam implantes entre os forames mentuais, área de maior quantidade óssea^{5,63}.

Peled et al.⁶³ (2003) realizaram um estudo de instalação de implantes em pacientes diabéticos tipo 2 controlados. Neste estudo 141 implantes foram instalados em 41 pacientes. Cerca de 2 a 4 implantes foram instalados na região anterior da mandíbula e posteriormente os implantes receberam próteses do tipo *overdentures*. As taxas de sucesso foram de 97,3% após 1 ano (na reabertura falha de 2 implantes) e 94,4% após 5 anos (2 implantes falharam após 2 anos de função). Com este estudo é possível determinar que pacientes diabéticos controlados quando bem selecionados podem ter bom índice de sucesso, mas diferentes níveis da doença e sucesso de implantes precisam ser esclarecidos.

Por outro lado, artigos revisados na literatura mostram taxas de sucesso dos implantes em pacientes diabéticos controlados variando entre 88,8% e 97,3% um ano após a cirurgia de instalação e de 85,6% a 94,6% um ano após a prótese estar em função⁵⁰. Quando comparadas com as taxas de sucesso em pacientes sem doença, o DM apresenta taxas de sucesso menores⁵⁵.

Fiorellini et al.²³ (2000) realizaram um estudo retrospectivo com 215 implantes instalados em 40 pacientes diabéticos controlados, 31 implantes

falharam, 24 falhas (11,2%) ocorreram após um ano de carga funcional. Esta análise mostrou uma taxa de sobrevida de 85,6% após 6 anos e meio. O maior número de perda de implantes aconteceu após 1 ano da instalação da prótese. Em outro estudo, Balshi, Wolfinger⁶ (1999) demonstraram uma taxa de sucesso de 94,3% antes da inserção da prótese em 227 implantes instalados em 34 pacientes diabéticos controlados.

Um estudo prospectivo com pacientes diabéticos tipo 2 controlado que receberam 178 implantes na mandíbula, apresentaram uma taxa de falha de 2,2% durante a osseointegração aumentando para 7,3% após 1 ano da cirurgia de instalação dos implantes, determinando uma taxa de sucesso de 92,7% após 1 ano da instalação e após 5 anos a taxa de sobrevida foi de 90%⁵⁶. De acordo com Farzard et al.²² (2002) e Peled et al.⁶³ (2003) a maioria das falhas nos implantes ocorre após o segundo estágio cirúrgico e durante o primeiro ano da prótese em função e pode ser inferido que alterações na microvascularização levam a uma diminuição na resposta imune e a uma redução no processo de remodelamento ósseo.

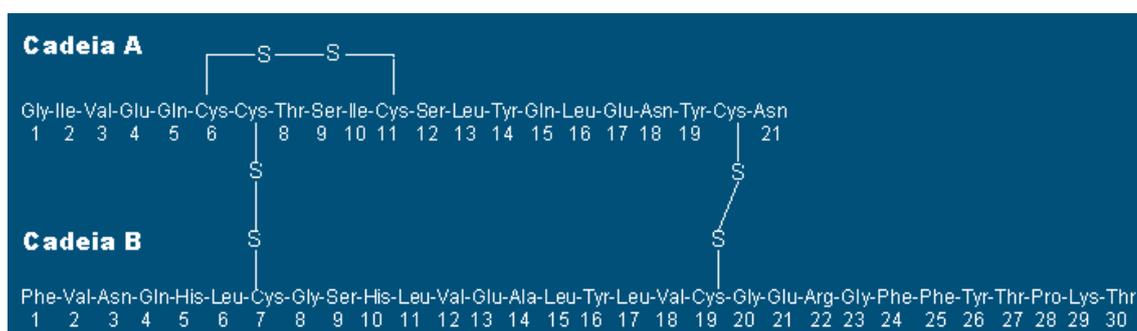
Recentemente, Balshi et al.⁵ (2007) avaliaram a estabilidade de 18 implantes *Brånemark System* que receberam carga imediata em pacientes diabéticos controlados com insulina, média de 71 anos de idade, na região anterior da mandíbula, durante um acompanhamento de 30 meses, por meio de análise da frequência de ressonância. Todos os 18 implantes permaneceram em função por dois anos e meio. A média de estabilidade dos implantes reduziu para 12,7% durante os primeiros 30 dias, e aumentou suavemente no período de 60 dias.

Durante os 30 meses de acompanhamento, a média de estabilidade dos implantes continuou a aumentar, mas não atingiu os valores medidos no início do experimento. Os autores concluíram que se as diferenças metabólicas nos pacientes diabéticos forem respeitadas é possível a instalação de prótese fixa total (protocolo de Brånemark) com carga imediata com obtenção de sucesso na osseointegração.

2.2.4 *Insulina*

A insulina é um hormônio que promove a entrada de glicose nas células e que também atua no metabolismo de lipídeos e proteínas¹⁸.

A constituição química da insulina consiste em uma estrutura covalente formada por duas cadeias de aminoácidos, podendo ser diferente nas espécies de mamíferos. Porém, as diferenças não afetam sua atividade biológica. A estrutura da insulina humana é apresentada abaixo:



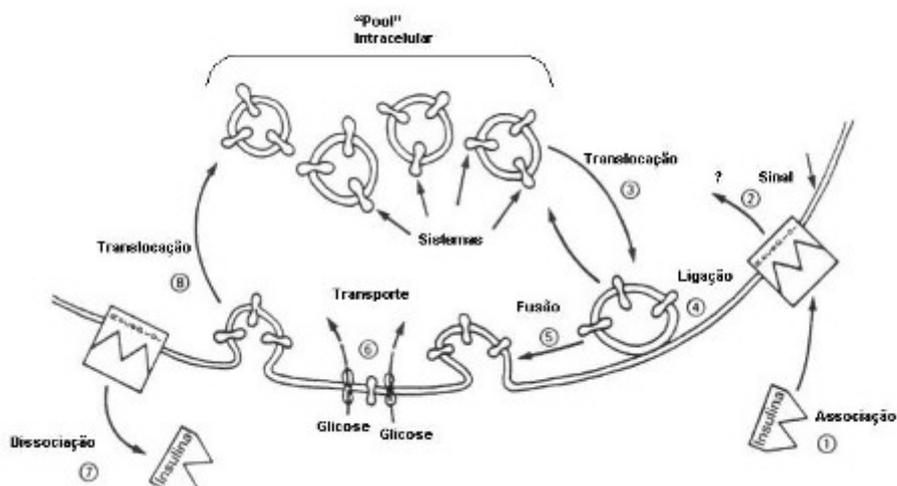
Esquema retirado do site da Unifesp (<http://www.unifesp.br/>)¹⁸

Existe uma semelhança muito grande entre os tipos de insulina humana, suína e bovina. A insulina suína difere em um único aminoácido, substituição de alanina ou treonina na posição B30, enquanto que a bovina tem esta modificação mais as substituições de alanina por treonina em A8 e valina por isoleucina em A10. Estas modificações não levam a mudança na atividade biológica e pouca diferença em antigenicidade. Embora todos os pacientes que recebem insulina heteróloga desenvolvem baixos títulos de anticorpos contra a molécula, poucos alcançam títulos clinicamente significativos. As insulinas suína e bovina são terapias padrão para DM, assim como a insulina humana, que é produzida pela técnica do DNA recombinante¹⁸.

A função da insulina consiste no transporte de glicose para o interior das células. Quando a molécula de insulina liga-se ao seu receptor ocorre um sinal que promove a translocação de vesículas que contém transportadores de glicose para a superfície da célula. O receptor de insulina nas células é um heterodímero constituído de duas subunidades, designadas a e b ligadas por pontes dissulfeto. Ambas as subunidades são extensivamente glicosiladas, e a remoção do ácido siálico e galactose diminuem a ligação e a ação da insulina. A subunidade a (PM = 135.000) é inteiramente extracelular e se liga à insulina via região rica em cisteína. A subunidade b (PM = 95.000) é a proteína transmembrânica que desempenha a segunda função principal do receptor o sinal da transdução. A porção citoplasmática da subunidade b tem atividade de tirosina quinase e um sítio autofosforilável. Os receptores de insulina são encontrados na maioria das células de mamíferos, em concentração acima de 20.000/célula.

Quando a insulina se liga ao receptor, ocorrem muitos eventos: mudança conformacional do receptor; cruzamento dos receptores formando microagregados; internalização do receptor e geração do sinal¹⁸.

No esquema abaixo é apresentado o mecanismo de ação da insulina na célula para a captação de glicose:



Esquema retirado do site da Unifesp (<http://www.unifesp.br/>)¹⁸

Existem vários tipos de insulina, com início e duração do efeito e período de concentração máxima variando conforme o tipo de insulina. A seleção da insulina mais apropriada ou a combinação delas dependem da resposta individual ao fármaco, das condições do DM e dos hábitos do paciente.

Os três tipos de insulina (humana, suína e bovina) causam efeito semelhante no homem e são denominadas insulinas regulares ou simples ou de

single peak (único pico de ação). São cristalinas, solúveis em água e com início do efeito imediato pela via venosa ou após 30 minutos pela via subcutânea. São também denominadas insulinas solúveis ou insulinas não modificadas. A insulina regular pode ser complexada com proteínas para liberação lenta (ex: insulina isofana ou NPH e insulina PZI) ou modificando o tamanho da partícula (ex: suspensão de insulina zinco). As insulinas bifásicas são constituídas por dois tipos de insulina de modo a proporcionar picos e tempos de duração diferentes durante o período de efeito^{18,82}.

Os diferentes tipos de preparação da insulina irão determinar a velocidade da absorção pelo tecido subcutâneo ou pela corrente sanguínea (início da ação) e pelo tempo que o organismo leva para absorver toda a insulina injetada (duração da ação). De acordo com a duração do efeito, podem ser classificadas como de curta duração (em torno de 6h - insulina regular ou simples), de efeito intermediário (duração até 24h) e de longa duração (em torno de 36 horas).

Evidências sugerem que a insulina atua no metabolismo do esqueleto, pois esta relacionada com a incorporação do aminoácido no osso, o aumento da síntese de nucleotídeo pelos osteoblastos e estimula a produção de colágeno *in vitro*⁸⁰.

Em consideração a insulino terapia e a osseointegração, os resultados são controversos na literatura. Embora a administração de insulina permita o restabelecimento dos níveis glicêmicos possibilitando a redução parcial das alterações ósseas provocadas pelo DM^{24,82}, a insulino terapia não mostrou uma cicatrização óssea completa em coelhos diabéticos controlados⁴⁸.

Fiorellini et al.²⁴ (1999) utilizaram parâmetros histométricos para comparar a cicatrização óssea ao redor de implantes em ratos diabéticos e ratos tratados com insulina. O DM foi induzido por uma injeção intraperitoneal de STZ. Implantes de titânio foram inseridos no fêmur de cada animal. Os resultados indicaram que a insulino terapia foi capaz de regular a formação de osso ao redor dos implantes nesse modelo experimental. Embora os parâmetros histométricos indicassem que a quantidade de formação óssea foi maior no grupo insulínico do que no grupo diabético, houve menos contato entre osso e implante de forma significativa em relação ao grupo controle (sem doença).

Também, Siqueira et al.⁸² (2003) avaliaram o comportamento do tratamento insulínico. Para isso, implantes de titânio foram instalados na tíbia de ratos *Wistar*, divididos em três grupos: controle, diabético induzido com aloxana e insulínico (2 UI/dia) e analisados em dois períodos (10 e 21 dias). Foram considerados diabéticos, o nível de glicemia >200mg/dL. As análises histológicas e histométricas determinaram uma redução de 50% na área de osso neoformado ($p < 0,001$) e de 50% no contato osso-implante ($p < 0,01$) nos ratos diabéticos após 21 dias da instalação do implante em relação ao grupo controle. No período de 10 dias não houve diferenças entre os grupos. O grupo insulínico retornou parcialmente aos níveis normais dos parâmetros ósseos analisados neste estudo. Na análise histológica, foi observado no grupo diabético, a presença de células parecidas com condrócitos envolvidos por uma matriz cartilaginosa, sugerindo um atraso no reparo ósseo, no grupo insulínico foi observada uma estrutura celular, células semelhante a osteoblasto, similar ao grupo controle. Os autores sugerem

que o reparo ósseo ao redor de implantes é regulado, pelo menos em parte, pela insulina.

Neste mesmo artigo, os autores explicam baseados na literatura, o processo dinâmico da formação óssea pelos osteoblastos e da reabsorção óssea pelos osteoclastos. As células osteoblásticas expressam receptores de insulina e as concentrações fisiológicas de insulina aumentam a produção de colágeno pelos osteoblastos e condrócitos em cultura de célula⁴⁵. Também tem sido demonstrado que células semelhantes à osteoclastos expressam receptores de insulina. A insulina inicia a resposta celular ligando-se ao receptor da tirosina quinase, que regula uma variedade de sinais do crescimento e do desenvolvimento do osso. Os substratos receptores de insulina (SRI) são proteínas essenciais no sinal de transdução que media o efeito da insulina na função celular¹⁰. A expressão de SRI-1 é limitada às células osteoblásticas e SRI-2 é expresso pelas células osteoblásticas e osteoclásticas. Observações em relação à expressão gênica para SRI 1 e 2 demonstraram que o SRI-1 é indispensável para a manutenção do *turnover* ósseo e o SRI-2 mantém a relação positiva entre a formação e reabsorção óssea. A integração desses sinais causa uma potente atividade anabólica do osso pela insulina e pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)¹⁰. Portanto, a ausência de insulina no organismo gera uma alteração no metabolismo ósseo.

Margonar et al.⁴⁹ 2003, avaliaram a influência do diabetes e da insulino terapia usando o torque de remoção de implantes em coelhos. O estudo foi constituído por três grupos (controle, diabético e insulínico -10 U/dia) e três

períodos (4, 8 e 12 semanas). Após a indução do DM com aloxana, foi instalado 1 implante na tíbia. Os valores do torque de remoção do implante foram estatisticamente superiores no grupo controle em relação aos grupos insulínico e diabético nos períodos de 8 e 12 semanas. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos insulínico e diabético em nenhum período. Reforçando esses resultados, Margonar⁴⁸ (2005) mostrou que seguindo a metodologia anterior, os três grupos não apresentaram diferenças em relação à área óssea. Para a extensão de contato osso-implante o grupo controle apresentou o maior valor ($p < 0,001$) e os grupos diabético e insulínico não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p = 0,75$). Assim, o DM influenciou negativamente a retenção mecânica de implantes e o contato entre osso-implante. A insulino terapia não foi capaz de modificar as alterações provocadas pelo DM, mas provavelmente devido a uma dificuldade da manutenção do controle metabólico nos coelhos diabéticos tratados com insulina.

Outros medicamentos são estudados na literatura no controle do DM. Kopman et al.⁴¹ (2005) analisaram o efeito da aminoguanidina e doxiciclina na região periimplantar de ratos diabéticos. Trinta e dois ratos *Sprague-Dawley*, divididos em quatro grupos (1 controle e 3 diabéticos), receberam implantes duas semanas após a indução do DM. Um grupo diabético recebeu administração intraperitoneal de aminoguanidina e outro grupo diabético recebeu via oral por gavagem de doxiciclina, ambos os medicamentos foram administrados diariamente a partir do dia da instalação do implante, durante 28 dias. O terceiro grupo diabético não recebeu medicação. Os resultados de contato entre osso e

implante mostraram que o grupo controle foi significativamente superior ao diabético sem medicamento ($p < 0,001$). O grupo que recebeu aminoguanidina foi estatisticamente superior ao grupo diabético ($p < 0,01$) e o grupo de doxiciclina não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo diabético ($p > 0,05$). De acordo com os autores, este estudo mostra que o DM prejudica a osseointegração. Em adição, a administração sistêmica de aminoguanidina reduz os efeitos da doença na osseointegração e a administração de doxiciclina melhora suavemente o parâmetro de osseointegração em ratos diabéticos.

2.2.5 Manutenção da osseointegração X Diabetes Mellitus

Em estudo recente e único presente na literatura, Know et al.⁴³ (2005) avaliaram a manutenção de implantes em diabéticos, instalados em 32 ratos divididos em dois grupos (diabético e insulínico) e em quatro períodos (1, 2, 3 e 4 meses). Após 28 dias da instalação dos implantes foi realizada a indução do DM (70mgSTZ/kg-via intraperitoneal) nos animais. O grupo insulínico recebeu duas aplicações diárias de insulina. A análise histométrica foi realizada por três examinadores e consistiu na determinação da porcentagem de contato do osso medular com o implante. O contato osso-implante medular foi maior para o grupo insulínico do que para o grupo diabético, nos quatro períodos analisados, sendo as diferenças significativas nos períodos de 2, 3 e 4 meses ($p < 0,001$). Os autores determinaram que a manutenção da osseointegração de implantes em ratos diabéticos controlados não foi comprometida por um período de 4 meses, porém

em animais diabéticos ocorreu uma redução do contato osso-implante que se caracteriza por ser tempo dependente.

Know et al.⁴³ (2005) explicaram, baseados na literatura, que no diabetes induzido em ratos ocorre uma perda da atividade da somatomedina, peptídeo com estrutura semelhante à insulina e atividade idêntica ao IGF-1. A somatomedina atua na formação óssea, media efeitos dos hormônios de crescimento no esqueleto e estimula a formação do colágeno e a síntese de DNA ósseo. Em adição, as complicações geradas pelo diabetes podem ser resultante da interação das AGEs com a superfície de óxido do implante. AGEs causam alterações qualitativas e quantitativas no componente da matriz extracelular do colágeno, laminina e vitronectina. A qualidade e quantidade de proteoglicanas também são afetadas no diabetes experimental. As AGEs no osso podem inibir de forma competitiva que proteínas de formação óssea consigam aderir na superfície do implante⁹.

Porém, nesse estudo não foi avaliado o comportamento em um grupo sem doença. Como a osseointegração ocorre pela associação da área óssea e pelo contato-osso implante, seria interessante avaliar o comportamento da área óssea diante dessas condições sistêmicas.

Em relação à manutenção da osseointegração dos implantes, mais estudos precisam elucidar o efeito do DM e da insulinoterapia utilizando métodos de análise como histológico, bioquímico, biomecânico e radiográfico.

2.3 Métodos radiográficos

O exame radiográfico periapical contribui na preservação dos pacientes, submetidos à reabilitação com implantes, devido à informação detalhada do padrão trabecular, além do baixo custo, maior disponibilidade dos aparelhos e de doses relativamente reduzidas^{89,93}. Recentemente é possível a obtenção de imagens digitais, tanto de forma direta ou indireta (digitalizada). O sistema digital consiste na obtenção da imagem do objeto direto na tela do computador por meio de um sensor ou de forma semi-direta por meio de uma placa de armazenamento de fósforo (PAF), após serem sensibilizados pelos raios-X. A imagem digitalizada consiste na transformação da imagem radiográfica convencional em digital, utilizando um escaner ou máquina fotográfica digital. Em ambos os sistemas, as informações são arquivadas em linguagem binária, possibilitando a manipulação da imagem e permitindo o envio das imagens para outros locais via internet. A manipulação da imagem pode melhorar a eficácia da interpretação radiográfica^{89,93}.

A manipulação da imagem digital ou digitalizada é um recurso disponível que poderá oferecer novas informações, sendo desnecessárias exposições radiográficas adicionais, com a possibilidade de aumentar a eficácia diagnóstica em função do tipo de lesão. Para a manipulação da imagem, podem-se utilizar os programas específicos que promovem uma alteração de brilho e contraste, magnificação, subtração, inversão e colorização. Também permitem determinar mensurações lineares e mostram a distribuição dos níveis de cinza^{89,93}.

De acordo com Wenzel, Gröndahl⁹⁷ (1995) para a detecção precoce da doença periimplantar assim como de tratamentos periodontais regenerativos, é necessário utilizar métodos de diagnósticos que apresentem exatidão e sensibilidade. Exames histológicos são considerados padrão-ouro, pois mostram a quantidade exata da alteração sofrida pelos tecidos. Entretanto, há duas limitações na análise histológica, o método histológico não descalcificado oferece apenas uma lâmina histológica da peça e não é possível realizar exame histológico em humanos, exceto se a remoção óssea não comprometer a integridade do paciente. Portanto, é desejável que métodos de diagnóstico não invasivos sejam utilizados em aplicações clínicas. O exame radiográfico é considerado não invasivo, porém a radiografia convencional apresenta um valor limitado de diagnóstico, na detecção de pequenas alterações ósseas. Cientificamente está comprovado que a quantidade de reabsorção óssea periodontal geralmente é subestimada, pela radiografia convencional. Esta limitação pode ser justificada pela imagem bidimensional das radiografias, fato que determina a sobreposição de várias estruturas anatômicas, impedindo a detecção de pequenas mudanças na densidade óssea. As faces vestibular e lingual não podem ser separadas, portanto as análises em relação às alterações do aspecto morfológico, como a falta ou alteração do trabeculado, formação de bordas escleróticas e mudanças de densidade bem definida não podem ser realizadas em uma análise radiográfica subjetiva. Todas essas afirmativas ocorrem porque o osso medular apresenta menor mineralização do que o osso cortical, então lesões restritas ao osso medular não são visíveis na radiografia, sendo necessário o envolvimento do osso cortical para as alterações

serem detectadas. Para se identificar radiograficamente alterações ósseas são necessárias à presença de 30% a 60% de alteração na mineralização óssea³⁷. A introdução da Subtração Radiográfica Digital (SRD) facilitou a detecção de pequenas alterações ósseas entre duas imagens, por um período de tempo. Com este método a progressão da doença ou o efeito de um tratamento pode ser avaliado de uma forma quantitativa^{72,75}.

2.3.1 *Densidade radiográfica*

A disponibilidade de programas de análise radiográfica permitiu que radiografias digitais ou digitalizadas pudessem ser analisadas, utilizando métodos como a análise da densidade. Os métodos de análise de densidade radiográfica são considerados mais sensíveis e não invasivos, viabilizando o acompanhamento radiográfico nas fases iniciais do remodelamento ósseo.

Em Implantodontia, a análise de densidade, baseado na análise dos níveis de cinza, foi empregada para medir a região óssea periimplantar ao redor de implantes, com diferentes tratamentos de superfície. Os resultados mostraram que a superfície rugosa apresentou uma maior densidade óssea radiográfica embora não tenha ocorrido diferenças estatísticas e foram similares a achados histológicos apresentados na literatura⁸⁶. Semelhante a metodologia anterior, Sakakura et al.⁷² (2006) avaliaram a influência da ovariectomia na densidade óssea periimplantar após a osseointegração estabelecida. Determinando que a análise óssea individualizada das diferentes regiões ósseas ao redor do implante foi significativamente menor ($p < 0,05$) na região medular ($77,48 \pm 23,39$ níveis de

cinza) do grupo ovariectomizado em relação aos grupos controle e sham – cirurgia fictícia ($91,61 \pm 32,10$ e $102,57 \pm 32,50$, respectivamente). Esta diferença não foi observada na região cortical. Neste mesmo estudo, os autores ressaltam que o sistema digital detecta uma variação de níveis de cinza de 0 a 256, fato que melhora a análise da imagem quando comparada com a capacidade do olho humano.

Estes resultados radiográficos nos permitem indicar a análise de densidade como um método adicional de avaliação na região periimplantar por oferecer um dado numérico da imagem radiográfica, além disso, é um método não invasivo, sem custos adicionais e de fácil execução. Porém, durante as tomadas radiográficas, um cuidado deve ser realizado para evitar variações nos fatores de exposição, devido ao risco de causar um viés no estudo. Uma forma é utilizar a escala de densidade de alumínio e relacionar os valores de densidade do osso com a densidade dos degraus da escala, pois é possível determinar a espessura em milímetros de cada degrau, evitando assim resultados falso-positivo ou negativo.

2.3.2 Subtração radiográfica digital (SRD)

2.3.2.1 Conceito de SRD

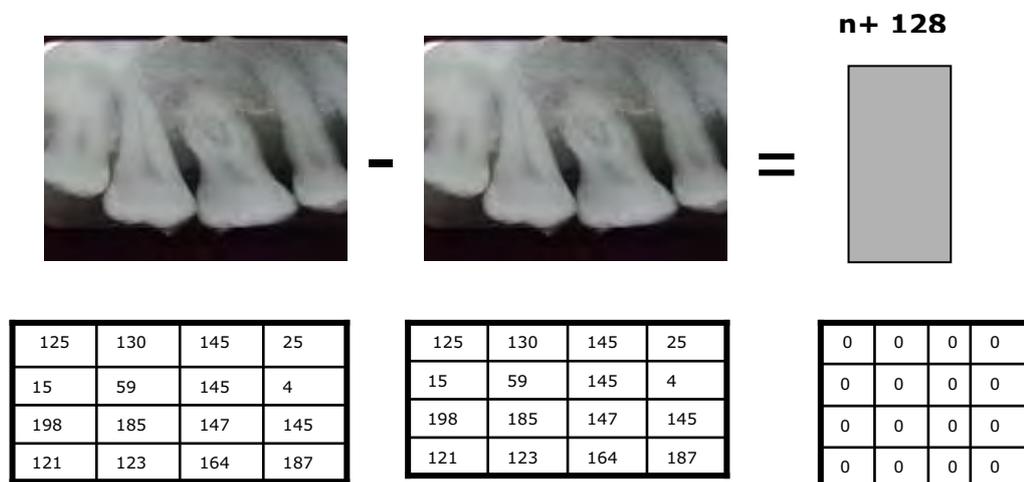
O artigo de Gröndahl, Gröndahl³¹ (1983) relatou que a técnica de subtração fotográfica foi descrita primeiramente por Ziedses des Plantes¹⁰² em 1961 para uso em exames de angiografia. Em 1962, Mathis, Hielscher⁵⁰ indicaram a possibilidade do emprego da SRD na Odontologia. O processo consistia na subtração de um par de radiografias realizadas em um intervalo de

tempo. Klein⁴⁰ (1967) sugeriu o emprego da subtração digital para análise de radiografias seriadas e Kasle, Klein³⁹ em 1976 demonstraram a precoce detecção de lesão periapical na subtração radiográfica digital quando comparada com a radiografia convencional.

A imagem radiográfica digital é representada por uma matriz matemática, na qual cada casa representa um pixel, cujo valor pode variar de 0 a 255 (tons de cinza em um sistema de 8 bits). Quando duas imagens radiográficas são subtraídas, o computador realiza uma operação de subtração entre uma matriz (imagem inicial) e outra (imagem final) gerando uma terceira matriz (imagem subtraída), os valores podem ser zero representa ausência de mudança, positivo ou negativo. Para facilitar a interpretação da imagem subtraída, os programas de SRD acrescentam automaticamente aos valores subtraídos o valor de 128, o que representa um tom médio de cinza. Portanto, quando um sítio sem alteração óssea for analisado pela subtração o resultado será um nível de cinza de 128. Os pixels de uma região onde ocorreu ganho de densidade deverão apresentar nível de cinza superior a 128. Pixels de uma região com perda de densidade apresentarão nível de cinza inferior a 128¹²⁻¹³.

Portanto, a operação de SRD pode ser resumida na seguinte fórmula:

(imagem inicial) – (imagem final) = imagem subtraída+128 (tom médio de cinza)



Esquema ilustrativo da técnica de subtração radiográfica digital.

2.3.2.2 Interferência (“Noise”)

Na SRD atenção é dada ao processo de padronização das imagens, para isso, as duas imagens a serem subtraídas devem apresentar a mesma projeção geométrica e densidade radiográfica^{31,33,70,98}.

Como a projeção geométrica reprodutível deve ser considerada de suma importância para a subtração, muitos pesquisadores têm utilizado dispositivos que buscam padronizar o alinhamento entre filme, objeto e fonte de raios-X. Em estudos clínicos, o alinhamento geométrico entre as radiografias pode ser obtido com posicionadores oclusais ou cefalostato. Os dispositivos para a padronização de séries radiográficas descritos previamente, geralmente são confeccionados com métodos de moldagem dos dentes, de resina acrílica ou

materiais de impressão e fixados entre filme, paciente e feixe de raios X^{57,69}. Os posicionadores oclusais permitem o alinhamento dos dentes em relação ao filme, porém esta condição é adequada para número pequeno de pacientes e para períodos de acompanhamento que não ultrapassem dois anos^{16,38} introduziram um método que combina o posicionamento cefalométrico da cabeça do paciente e o aumento da distância foco-objeto, a desvantagem desse método, relatada pelos autores, é o alto custo do dispositivo. Nummikoski et. al.⁵⁹ (2000) em um estudo de validação mostrou não haver diferenças entre essas duas técnicas para obtenção da projeção geométrica.

Em relação à densidade radiográfica, as mudanças na densidade óssea podem ser avaliadas como ganho ósseo, sem alteração e perda óssea. Além disso, para a padronização da densidade radiográfica deve ser padronizado o tempo de exposição, a quilovoltagem e a miliamperagem, o processamento e a digitalização do filme radiográfico^{12-13,31,33,70,75,77,98}. Algumas distorções de projeção e variação de densidade durante a obtenção das imagens podem gerar resultados na imagem subtraída, que não são originários do processo de doença/tratamento ocorrido no período compreendido entre as duas imagens radiográficas. Esse resultado falso-positivo ou negativo conceitua-se como interferência da imagem⁹⁸.

Devido a esta limitação, os programas de SRD devem ser capazes de compensar pequenas interferências que inevitavelmente ocorrem na obtenção de duas imagens padronizadas. Programas de SRD prévios proporcionavam uma sobreposição manual, e pequenos desajustes geométricos eram corrigidos com

movimentos rotacionais e translacionais⁹⁶. O ajuste geométrico disponível nos programas atuais é baseado em pontos de referência que permitem um ajuste matemático e automático entre a imagem inicial e a final, facilitando a obtenção de uma melhor sobreposição das imagens^{32,99}.

Além da correção de pequenas interferências provenientes da tomada radiográfica é preciso caracterizar se a origem da diferença presente na imagem subtraída é devido a uma alteração fisiológica do tecido ósseo (noise), como por exemplo, o crescimento do animal, ou ao tratamento instituído (sinal). Para isso, a interferência pode ser quantificada pelo desvio-padrão do histograma determinada na região de controle. O desvio-padrão define a distribuição dos níveis de cinza na imagem subtraída⁹⁸.

Segundo Wenzel, Sewerin⁹⁸ (1991) uma imagem subtraída homogênea é aquela que apresenta uma pequena variação nos tons de cinza em seus pixels. O uso do histograma, na região de controle (RC), fornece a amplitude de variação nos tons de cinza na imagem subtraída. Histogramas da RC com grande amplitude de tons de cinza podem significar que há grande quantidade de interferência. De qualquer forma, toda imagem subtraída apresenta interferência que não pode ser evitada e isso deve ser considerado na avaliação quantitativa das alterações na densidade óssea. Nesses casos recomenda-se considerar como interferência um ou mais desvios-padrão observados no histograma da RC da imagem subtraída. Schou et al⁷⁶ (2003), avaliando regeneração óssea ao redor de defeitos peri-implantares em macacos encontraram um desvio-padrão de 10 níveis de cinza nas regiões de controle e consideraram como alteração óssea de

ganho/perda 128 mais ou menos dois desvios-padrão (20 níveis de cinza). Schropp et al.⁷⁸ (2003) avaliando a remodelação óssea pós-extração dentária também utilizou dois desvios-padrão como interferência na análise por SRD. Entretanto, segundo Wenzel⁹⁶ não existe um número de desvios-padrão correto a ser adotado e deverá ser definido a critério do pesquisador dependendo da natureza de cada experimento e do grau interferências entre as duas imagens digitais.

2.3.2.3 Precisão da SRD

Uma vantagem da SRD em relação à radiografia convencional é que a subtração oferece um resultado quantitativo sem considerar o osso pré-existente. De acordo com van der Stelt⁹⁰ (1989) a limitação da radiografia convencional em detectar pequenas alterações ósseas é devido à presença da sobreposição das estruturas anatômicas na região de interesse, dificultando significativamente o diagnóstico. Outros estudos demonstram uma pequena relação entre as medidas clínicas de sondagem do nível de inserção e as medidas obtidas da radiografia convencional. Mas com a subtração radiográfica a relação entre avaliação radiográfica e medida clínica é aumentada.

Mensurações realizadas em radiografias convencionais e digitais demonstram alterações ósseas somente em dois planos (ex. altura e largura óssea), por outro lado, a SRD pode proporcionar informações a respeito das alterações ósseas em relação à densidade óssea e área. Christgau et al.¹³ (1998) demonstraram em estudo *in vitro* uma alta correlação entre aumento de espessura

e mudança na densidade óssea, detectada pela SRD. As correlações lineares variaram de 0,89 a 0,99 para osso cortical e 0,61 a 0,86 para osso medular. Aumentos de 200 μ m no osso cortical e de 500 μ m no osso medular foram detectados na SRD, já para a detecção na radiografia convencional, os aumentos ósseos necessários foram de 600 μ m e de 2850 μ m respectivamente para o osso cortical e medular.

As alterações na massa de cálcio também são detectadas pela SRD. Christgau et al.¹² (1998), em estudo in vitro, demonstraram uma alta correlação linear entre alterações de cálcio na massa óssea e mudanças na densidade óssea detectada por SRD. Uma média de 0,1-0,15mg de cálcio foi o mínimo de perda óssea necessária para a detecção na SRD.

Assim, a SRD pode ser aplicada com o objetivo de detectar discretas alterações em tecido duro como osso, esmalte e dentina^{37,78}. Devido a precoce detecção de alterações, a subtração está sendo empregada em diversas áreas da Odontologia como evolução de cáries, lesões periapicais, progressão da doença periodontal e periimplantar, acompanhamento da osseointegração em implantes dentários e eficácia de tratamento.

2.3.2.4 Emprego de SRD em Periodontia e Implantodontia

Em específico na Periodontia e Implantodontia, a SRD tem fundamental importância na detecção de sutis alterações ósseas ocasionadas pelas doenças periodontal e periimplantar, proporcionando uma intervenção profissional

mais precoce³⁷. Essa técnica também é empregada na avaliação dos resultados de terapias regenerativas como enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada oferecendo resultados qualitativos e quantitativos^{12-13,75-77} bem como no estudo da remodelação óssea em humanos⁷⁴.

Em Periodontia Wenzel et al.⁹⁹ (1992) realizaram um estudo comparando a subtração radiográfica digital e a radiografia convencional com as medidas clínicas de defeitos ósseos periodontais tratados cirurgicamente com a técnica de regeneração tecidual guiada. O período de análise foi 6 e 12 meses após a cirurgia. Não houve uma correlação significativa entre as medidas clínicas e avaliação na radiografia convencional $r=0,28$ enquanto uma forte correlação entre a SRD e as medidas clínicas. Uma possível explicação seja devido ao fato da SRD eliminar o osso pré-existente do defeito ósseo e depois ser capaz de detectar o preenchimento ósseo da região estudada.

Resultado semelhante foi apresentado no estudo de Cury et al.¹⁶ (2004) que compararam a radiografia convencional e a SRD no acompanhamento longitudinal de defeitos de furca grau II após o tratamento cirúrgico de raspagem ou regeneração óssea nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses. Os resultados mostraram baixa concordância entre as radiografias convencionais e a subtração radiográfica digital ($Kappa < 0,36$) assim como baixa concordância entre os examinadores na interpretação de radiografias convencionais ($Kappa < 0,40$). Os acertos do diagnóstico de áreas ósseas modificadas e não modificadas variaram entre 38,9% e 47,2% para os três examinadores. Portanto, este estudo mostra a

superioridade da SRD em relação à radiografia convencional para acompanhamento deste tipo de lesão.

Gröndahl, Gröndahl³¹ (1983) realizaram um estudo comparando a validação radiográfica de defeitos ósseos periodontais, criados no osso vestibular e proximal na região de pré-molar e molar em mandíbula humana macerada. Foram realizadas duas tomadas radiográficas, a radiografia inicial sem defeito e a radiografia final com defeito ósseo. Dez examinadores analisaram as radiografias convencionais, inicial e final, e a radiografia resultante da subtração radiográfica quanto à presença de defeitos ósseos. Os resultados mostraram $72,8\% \pm 9,1\%$ de diagnóstico correto para a radiografia convencional e $93,8\% \pm 1,9\%$ de diagnóstico correto para a radiografia de subtração. Os autores concluíram que a subtração poderia ser um método adequado para estudos longitudinais da doença periodontal, devido à superioridade da precisão diagnóstica em relação à radiografia convencional.

Na Implantodontia a SRD pode ser empregada na análise de terapias regenerativas como apresentado por Schou et al. (2003)⁷⁵⁻⁷⁷. Os autores realizaram um estudo de periimplantite experimental ao redor de 64 implantes instalados em macacos. Quando a periimplantite causou defeitos ósseos de 4mm-6mm, terapias regenerativas foram estabelecidas, sendo elas: 1 - enxerto ósseo particulado e membrana de e-PTFE; 2- somente enxerto ósseo particulado; 3- somente membrana de e-PTFE e 4 – apenas cirurgia de retalho para debridamento. Após seis meses da cirurgia regenerativa, os animais foram sacrificados e análise clínica, histológica e radiográfica foram realizadas. Os resultados da SRD e

histológica foram semelhantes, ambas determinaram que todos os grupos apresentaram ganho ósseo após 6 meses da cirurgia, porém o grupo em que o enxerto ósseo particulado foi associado a membrana de e-PTFE houve um ganho ósseo maior tanto no histológico (45% média de contato osso-implante) quanto na SRD (172 média de ganho de níveis de cinza) em relação aos demais grupos, cujo resultados do histológico foram 22% para grupo somente osso, 21% para grupo somente membrana e 14% para o grupo controle. A média dos valores de ganho de níveis de cinza da SRD foi 157 para os três grupos. Portanto, com estes resultados os autores concluíram que a SRD pode ser utilizada com segurança para este tipo de experimento. Em um terceiro estudo, a indicação do emprego da SRD é confirmada, pois, Schou et al.⁷⁷ (2003) seguindo o mesmo delineamento experimental para avaliar a capacidade de regeneração do osso bovino mineralizado (Bio-Oss[®]) encontraram resultados semelhantes entre a SRD e o histológico e com os valores dos estudos anteriores.

Recentemente, Sakakura et al.⁷¹ (2007) utilizaram a SRD para analisar a influência da administração de ciclosporina A no tecido ósseo ao redor de implantes já osseointegrados em coelhos. Os resultados mostraram um valor significativamente menor de densidade radiográfica, determinado pelo ganho dos níveis de cinza, entre o grupo teste e os grupos controles. Neste estudo, os autores determinaram a importância deste método para detectar pequenas alterações ósseas que o osso pode sofrer com a influência de fármacos.

2.3.2.5 *X-PoseIt*

Este programa de subtração radiográfica está baseado no posicionamento de ilimitados pontos de referência, com o objetivo de permitir o alinhamento das duas imagens a serem subtraídas. Após o posicionamento dos pontos de referência nas duas imagens a serem subtraídas, a precisão dos pontos é conferida e em seguida são realizadas as correções de alinhamento (rotação, translação, tamanho, distorção). A qualidade da SRD reduz com o aumento dos desvios geométricos entre as duas tomadas radiográficas, devido a esse fato os programas de subtração buscam desenvolver ferramentas para atenuar esta dificuldade⁶⁹. A precisão da sobreposição manual das duas imagens é outro fator de interferências, pois depende da destreza manual e da precisão da colocação dos pontos de referência. Um estudo demonstrou que 10 pontos de referência são suficientes quando as imagens inicial e final são bem padronizadas e 15 pontos de referência devem ser utilizados para imagens com menor padronização¹. O *X-PoseIt* também permite a correção gama automática com o objetivo de padronizar a densidade e o contraste das radiografias a serem subtraídas.

No programa é possível definir várias regiões de controle e interesse com auxílio do *mouse*. Tanto os pontos de referências como as regiões de interesse/controlado podem ser eliminadas e refeitas. Também é possível definir, em nível de cinza, a interferência provocada pelo processo de exposição/processamento da radiografia. Isso é feito por meio das opções do programa, onde podem se definir quantos desvios-padrão serão considerados na subtração.

Nas imagens subtraídas, as regiões que sofreram perda ou ganho ósseo aparecem, respectivamente, mais escuras e mais claras que a imagem subtraída. O programa permite que essas alterações sejam coloridas de acordo com a necessidade do pesquisador.

Todos os dados quantitativos referentes ao nível de cinza e à área, tanto da região de ganho, de perda ou de ausência de alterações são automaticamente exportados para um banco de dados para futura análise estatística.

Um estudo realizado por Haiter-Neto, Wenzel³² (2005) comparando os programas de subtração *X-PoseIt* e *Emago* determinaram que as imagens subtraídas no *X-PoseIt* apresentaram menor interferência na imagem, devido ao valor de desvio-padrão do histograma dos níveis de cinza ser significativamente menor (6,2) em relação ao *Emago* (7,8) ($p < 0,05$). Além disso, os autores consideram que o programa *X-PoseIt* tem uma maior capacidade de sobrepor as imagens e corrigir variações na projeção geométrica entre as duas imagens. O programa *Emago* permite a colocação somente de quatro pontos de referência.

3 Proposição

A proposição geral desse estudo foi avaliar o efeito do *Diabetes Mellitus* e da insulino terapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes instalados na tíbia de ratos.

Sendo as proposições específicas:

Avaliar bioquímica, radiográfica, biomecânica e histometricamente o efeito do *Diabetes Mellitus* e da insulino terapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes.

4 *Material e Método*

4.1 *Estudo piloto*

O estudo piloto foi realizado com 23 animais visando a determinação da dose de estreptozotocina (STZ) e da via de administração para indução do DM, da dose adequada de insulina e dos exames bioquímicos na urina. Este estudo foi realizado para estabelecer esses parâmetros em ratos adultos de grande porte, com cinco meses de vida e 500g de peso corporal, aproximadamente, pois não havia na literatura estudos que fornecessem informações para esses animais. Foram dois meses de acompanhamento, que correspondeu ao tempo de observação do DM. Os resultados do estudo piloto permitiram estabelecer as seguintes determinações, para a metodologia do experimento:

1 – Os melhores resultados da indução de *Diabetes Mellitus* em ratos adultos foram obtidos com a administração intravenosa, pela veia peniana, e na concentração de 40mg STZ/Kg. Nestes parâmetros o nível glicêmico inicial (350 ± 18 mg/dL) foi considerado diabético e durante o experimento o nível glicêmico foi aumentando (final: 524 ± 49). Portanto, durante o período experimental, com essa dosagem os animais permaneceram diabéticos por dois meses, houve baixo índice de morte, apenas 1 animal, e ausência de reversão do quadro clínico (Anexo 2).

2 – Após 5 monitoramentos da insulina, determinou-se que duas administrações diárias de insulina, sendo 5U na dose noturna e 3,5U na dose diurna, oferecem níveis glicêmicos aceitáveis para o grupo insulínico. O monitoramento de 24 horas determinou que o nível glicêmico em animais diabéticos controlados não é permanente, portanto após a administração o nível glicêmico reduz consideravelmente a níveis próximos de hipoglicemia e ao final de 12 horas o nível glicêmico é alto necessitando de outra administração insulínica.

3- O exame bioquímico determinou que valores de cálcio na urina foram estatisticamente superiores nos animais diabéticos em relação ao controle, porém no sangue esta diferença não foi observada.

4.2 Amostra

Foram utilizados, neste estudo, 80 ratos *Wistar* machos com aproximadamente três meses de idade e inicialmente peso médio corporal de 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura, umidade e luz controlada, tendo acesso à ração e a água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação em Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, processo n° 27/2003 (Anexo 1).

Os animais foram divididos em 3 grupos, como é apresentado no quadro a seguir:

Período		2 meses	4 meses	Total
Grupo	Finalidade estudo			
Controle (C)	Torque	10	10	20
	Histométrico	10	10	20
Diabético (D)	Torque		10	10
	Histométrico		10	10
Insulínico (I)	Torque		10	10
	Histométrico		10	10
Total		20	60	80

A divisão de cada grupo, em animais para análise do torque de remoção do implante e em animais para análise histométrica ocorreu devido ao procedimento de análise dos resultados. Após a realização do torque de remoção do implante, o implante é deslocado do osso inviabilizando a análise histométrica neste mesmo animal. As análises radiográfica e bioquímica foram realizadas em todos os animais.

Grupo controle (C) – 40 animais.

- Grupo controle torque (CT): 20 animais.
- Grupo controle histométrico (CH): 20 animais.

O grupo controle foi subdividido em 2 períodos (2 e 4 meses). O período de 2 meses foi realizado para avaliação da osseointegração antes da indução do DM.

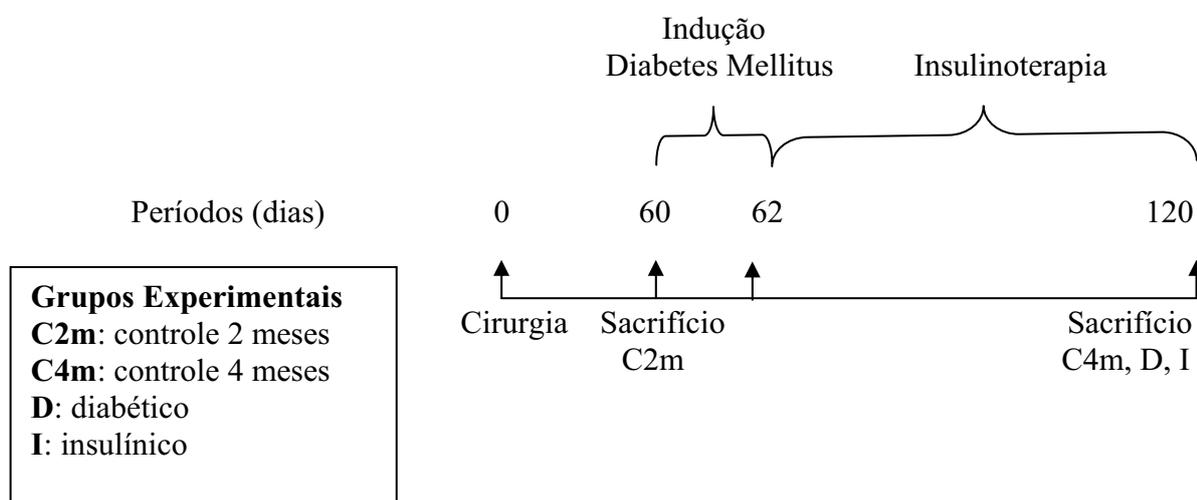
Grupo diabético (D) – 20 animais.

- Grupo diabético torque (DT): 10 animais.
- Grupo diabético histométrico (DH): 10 animais.

Grupo insulínico (I) – 20 animais.

- Grupo insulínico torque (IT): 10 animais.
- Grupo insulínico histométrico (IH): 10 animais.

Os animais foram sacrificados nos períodos de 60 dias (2 meses) e 120 dias (4 meses) após a cirurgia de instalação do implante, como é apresentado no esquema a seguir:



4.3 Procedimento cirúrgico

Os animais receberam anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina (Quetamin® - Virbac do Brasil Ltda, Brasil.) na proporção de 0,08mL/100g de peso corporal, sedação e analgesia com injeção intramuscular em dose única de xilasina (Dopaser® - Bayer S. A – Saúde Animal, Brasil) na proporção de 0,04 mL/100g de peso corporal e aplicação de Cloridrato de Prilocaína a 3% com Felipressina (Citanest®) para anestesia local e hemostasia do campo operatório. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia na região a ser operada (Figura 1). A anti-sepsia foi realizada com gaze estéril embebida em solução de iodo (Figura 2).

Uma incisão de aproximadamente três centímetros foi realizada, em planos, na região interna da perna do animal, sobre a metáfise tibial (Figura 3). Após uma dissecação delicada (Figura 4), o tecido ósseo foi submetido à osteotomia realizada por meio de uma seqüência progressiva de fresas (fresa lança; fresa espiral de 2.0mm)(Figuras 5 e 6) para acomodar um implante de titânio (Titanium Fix® – As Technology , São José dos Campos, Brasil) com superfície lisa com as seguintes dimensões: 4mm de comprimento e 2,2mm de diâmetro(Figura 7). Todas as perfurações foram realizadas com um motor elétrico ajustado a 1200 rpm (BLM 600 – Driller®), sob abundante irrigação salina estéril. O implante foi instalado com uma chave manual

Um total de 80 implantes de titânio comercialmente puro com superfície maquinada, esterelizados por raios gama, foram instalados nos animais sendo um implante em cada animal (Figura 8).

Os tecidos foram suturados com pontos interrompidos com fio seda (Seda Ethilon 3.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) (Figura 9). Os animais receberam dose única de antibiótico (0,1 ml/Kg) (Pentabiótico®, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e analgésico (15mg/Kg) (três gotas de paracetamol – Tylenol bebê – Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA).

		
FIGURA 1 - Animal com a perna direita tricotomizada.	FIGURA 2 – Anti-sepsia com solução de iodo.	FIGURA 3 – Incisão.
		
FIGURA 4 – Osso da tíbia exposto após o descolamento dos tecidos moles.	FIGURA 5 – Perfuração com a fresa lança.	FIGURA 6 – Perfuração com a fresa espiral 2.0mm.
		
FIGURA 7 – Implante de superfície lisa de 4mm x 2,2mm.	FIGURA 8 – Implante instalado.	FIGURA 9 – Sutura.

4.4 *Indução de Diabetes*

Após dois meses da cirurgia de instalação dos implantes, os animais do grupo C2m foram sacrificados e os animais dos grupos C4m, D e I permaneceram um período de 16 horas de jejum, exceto água ad libitum. Após o período de jejum, os animais foram aleatoriamente selecionados nos Grupos Diabético (D) e Insulínico (I) receberam dose única de estreptozotocina (STZ) (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvida em tampão citrato (0,01M pH 4,5), na concentração de 40 mg STZ/Kg, pela veia peniana, como estabelecido no estudo piloto (Anexo 2). A indução foi realizada sob anestesia inalatória com éter. A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga (Figuras 10 e 11).

4.4.1 *Preparo da STZ*

No dia anterior à administração, todos os animais foram pesados e foi calculado a média do peso corporal. O cálculo foi realizado da seguinte forma:

40mg STZ -----1000 g de peso corporal

c ----- média de peso corporal (g)

c= quantidade de STZ (mg) que será aplicada de acordo com o peso corporal.

Cada animal recebeu a droga dissolvida 0,2mL do tampão citrato, em média. Assim:

Média de peso corporal (g) -----0,2mL de tampão citrato

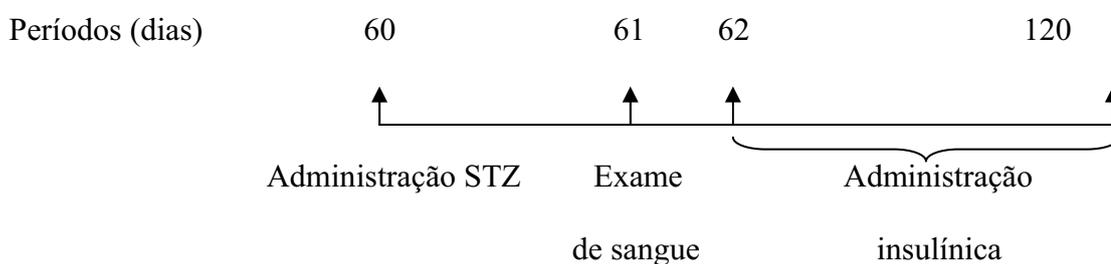
Peso de cada animal no dia da administração (g) ----- d (mL de solução)

4.5 *Controle glicêmico*

Após 24 horas da indução do DM, foi feita a comprovação do quadro diabético por meio da análise da taxa glicêmica⁶⁵.

A determinação da glicemia foi realizada por meio da coleta de sangue após corte com tesoura a cerca de 2mm da extremidade distal da cauda de cada animal, o qual permaneceu em uma caixa aquecida durante 2 minutos para a vasodilatação (Figura 12). As amostras de sangue foram coletadas em Eppendorf, contendo liquemine (Roche, São Paulo, Brasil) (Figura 13). Após centrifugação do sangue (2500 rpm por 10 minutos) (Figura 14) para obtenção do plasma foi realizado o teste de glicemia pelo método enzimático da glicose-oxidase (Kit colorimétrico de Glicose PAP Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) no laboratório da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Bergmeyer, Bernt⁷ 1974). A taxa glicêmica foi avaliada periodicamente durante o experimento. Para critérios de inclusão, foram aceitos animais com glicemia inicialmente superior a 300mg/dL, visto que a taxa glicêmica de ratos com diabetes induzido varia de 250 a 600mg/dL e de ratos não diabéticos, nas condições de coleta de sangue usadas pelo laboratório a glicemia chega ao máximo 160mg/dL⁶⁴⁻⁶⁵. Os animais foram separados nos grupos diabético e insulínico, após a indução, por meio de pareamento utilizando os valores de glicemia.

O esquema a seguir, mostra o período de indução do *Diabetes Mellitus* e da administração da insulina. A indução do DM foi após o período de osseointegração dos implantes (60 dias).



4.6 Administração de insulina

4.6.1 Grupo I

Duas injeções diárias subcutâneas de insulina humana NPH (Neutral Protamine Harguerdon) (Biohulin NU-100, 100 U/ml, Biobrás, Montes Claros, MG, Brazil) sendo 3,5 unidades no período da manhã (6 horas) e 5 unidades no período noturno (18 horas), estabelecido pelo piloto, foram administradas nos animais do grupo I durante 58 dias. A insulina foi diluída em solução de cloreto de sódio a 0,9% totalizando 0,25ml (Figura 15).

4.6.1.1 Preparo da insulina

A solução de insulina foi preparada todos os dias pela manhã e pela noite a partir da solução-mãe que contém 100U/mL.

Primeiramente, o número de Unidades de insulina por mL de insulina foi calculado:

Exemplo: 3,5 U de insulina ----- 0,25mL de insulina

Y ----- 1 mL de insulina

$$Y = 14 \text{ U/mL de insulina}$$

A quantidade diária de solução correspondia à:

0,25mL de insulina x 10 ratos x 1 aplicação (6 horas) = 2,5mL de insulina, que foram preparados diariamente, pela manhã.

A solução-mãe de insulina continha 100U/mL, portanto, para calcular qual o volume a ser pipetado desta solução, tem-se:

$$14 \text{ U/mL} \times 2,5 \text{ mL} = 100 \text{ U/mL} \times V$$

V = 0,35mL de insulina 14 U/mL, sendo V o volume a ser pipetado da solução de 100 U/mL

Como se deve preparar 2,5mL de solução e já se tem 0,35mL de insulina, a diferença corresponde a quantidade de solvente, no caso, a salina:

2,5 mL de solução – 0,35mL de insulina = 2,15mL de salina a ser adicionada à 0,35mL de insulina 100U/mL.

O mesmo cálculo foi realizado para a dose de insulina noturna.

4.6.2 Grupos C e D

Os grupos controle e diabético receberam injeções diárias de cloreto de sódio a 0,9% contendo o mesmo volume (0,25mL), o mesmo intervalo de tempo e pela via de administração do grupo I durante todo o período experimental.

Os animais foram sacrificados com sobredose do anestésico geral após 2 meses da indução do DM.



FIGURA 10 – Streptozotocina.



FIGURA 11 – Indução do Diabetes Mellitus pela veia peniana.



FIGURA 12 – Aquecimento do animal para vasodilatação da veia caudal.



FIGURA 13 - Coleta de sangue da cauda.



FIGURA 14 – Centrífuga de Eppendorf.



FIGURA 15 - Biohulin nu-100 insulina humana NPH (neutral protamine harguerdon) (100 u/ml).

4.7 Obtenção da imagem radiográfica

4.7.1 Radiografia convencional

As tomadas radiográficas foram realizadas em dois momentos do experimento: após a instalação do implante e no sacrifício, utilizando filme radiográfico periapical Kodak Insight. O filme radiográfico foi posicionado paralelo ao implante por meio de um posicionador especialmente confeccionado para este fim (Figuras 16 e 17). Para a realização da tomada radiográfica foi utilizado o aparelho de raios-X com os seguintes fatores de exposição: 0,6 segundos, 65 kVp, 10 mA e 40cm de distância foco/filme. Após o processamento radiográfico automático, as radiografias foram digitalizadas com uso de um escaner (Snapscan TPO, Agfa Taiwan, China) com um adaptador de transferência de radiografia (Snapscan 1236 s, Agfa, Taiwan, China). As imagens foram digitalizadas com resolução de 640 dpi, tamanho da imagem de 985x726 dpi e tamanho do pixel de 40 μ m. As imagens digitalizadas foram arquivadas com o

formato TIFF (Tagged Image File Format) e armazenadas no disco rígido do computador. Essas imagens digitalizadas foram utilizadas para a análise de Subtração Radiográfica Digital.



FIGURA 16 – Posicionador determinando o paralelismo do filme radiográfico com o implante e perpendicular ao feixe de raios-x.



FIGURA 17 – Chave adaptada ao implante e filme radiográfico paralelo ao implante.

4.8 *Análise radiográfica*

4.8.1 *Subtração radiográfica digital*

As imagens digitalizadas foram importadas para o programa de subtração digital (*X-PoseIt*, versão 3.1.17, Image Interpreter System, Denmark). As duas imagens radiográficas foram abertas no programa e posicionadas lado a lado. Dez pontos de referência foram posicionados ao redor do implante utilizando o *mouse*, especificamente na extremidade das espiras ao longo dos dois lados do implante (cinco pontos de cada lado) na mesma posição em ambas as imagens inicial e final (Figura 18). A precisão dos pontos de referência foi avaliada por meio de uma ferramenta de precisão presente no programa e os pontos foram reposicionados, se a distância entre os dois pontos fosse maior que 2 pixels.

Para restringir as áreas de análise, as regiões de interesse foram determinadas na radiografia inicial e automaticamente transferidas para a imagem final. A região de osseointegração (RO) foi uma janela retangular com 10 pixels de largura e três espiras do implante de altura envolvendo o osso próximo ao implante. Esta região de interesse foi desenhada na mesial e distal do implante. A outra região foi a de controle (RC) que compreendia uma região de osso cortical localizado distante da RO, a RC foi uma janela com dimensão de 1000 pixels² com a função de corrigir interferências não detectadas pelo programa e pelas mudanças ósseas fisiológicas, provocadas pelo remodelamento ósseo (Figura 19).

O histograma de distribuição na RC determinou que um desvio padrão da escala de cinza da RC na imagem subtraída poderia ser interpretado

como um sinal ou uma interferência na imagem subtraída. Quando é usado um desvio-padrão dos níveis de cinza isto corresponde à média de 3,68 níveis de cinza. A subtração radiográfica foi realizada automaticamente pelo programa e os dados foram estocados no banco de dados do programa. Para facilitar a visualização, a imagem subtraída, apresentada pelo programa, foi mostrada com a adição de 128 tons de cinza. O resultado da subtração, nas regiões de osseointegração, mostrou áreas de ganho em claro e áreas de perda em escuro (Figura 20). O programa também permitiu que a imagem subtraída fosse apresentada em cores, o azul representava ganho e a vermelha representava perda.

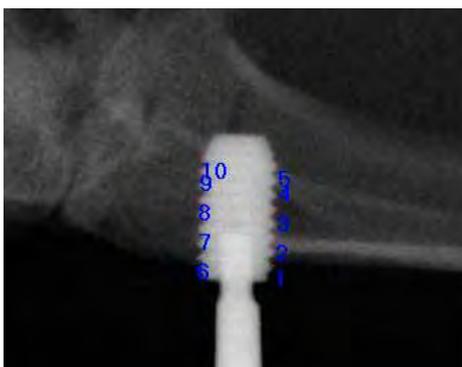


FIGURA 18 – Dez pontos de referência inseridos ao longo do implante.

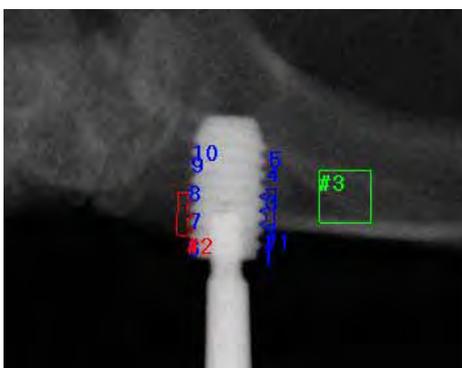


FIGURA 19 – Região de osseointegração (#1e2) localizado no osso entre as três espiras iniciais e região de controle (#3).

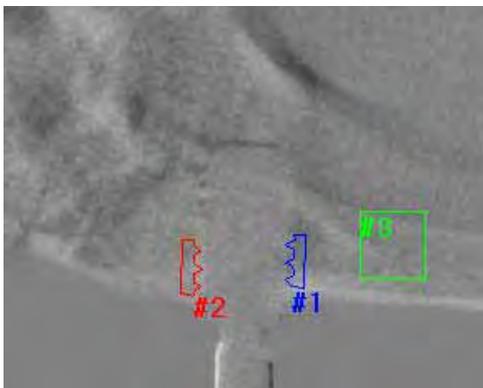


FIGURA 20- Imagem subtraída com a região de osseointegração (escuro significa perda e branco significa ganho).

4.9 Análise do torque de remoção do implante

Após o sacrifício, a tíbia, contendo o implante dos animais que seriam submetidos ao torque de remoção do implante foi removida. Com o auxílio de um torquímetro manual (15-BTG, Tonich, Japan.), a peça foi mobilizada e o implante foi removido com um movimento anti-horário do aparelho de forma que o valor mínimo de torque necessário para o rompimento da osseointegração fosse registrado em N.cm para cada implante. Não foi aplicado força na direção vertical para evitar alterações nos dados.

4.10 Análise bioquímica

A análise bioquímica foi realizada em todos os animais de cada grupo, na parte para o estudo histométrico e para o estudo do torque de remoção.

Durante o experimento foram realizadas cinco determinações bioquímicas, nos seguintes períodos: - antes da cirurgia de instalação dos implantes (Dia 1); - antes da indução do diabetes (Dia 60); - 20 dias após a indução do diabetes (Dia 80); - 40 dias após a indução do diabetes (Dia 100) e - 60 dias após a indução do diabetes (Dia 120). Exceto para o teste de glicemia que também foi realizado o exame 1 dia após a indução do DM.

No plasma foi determinado a concentração de glicose, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Para isso, 1500 µl de sangue foram coletados de cada animal. A amostra foi centrifugada à 2500 rpm por 10min para a separação do plasma. Todos os exames foram realizados por meio do método colorimétrico utilizando o Kit Labtest Diagnóstica[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com as normas do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL. Os exames foram realizados sempre pelo mesmo operador, previamente treinado. As amostras eram numeradas de forma que o operador desconhecia a que grupo pertencia o animal.

Dois dias antes da coleta do sangue, os animais foram colocados em gaiola metabólica individual permitindo assim, a adaptação dos animais (Figura 21). O objetivo da gaiola metabólica era poder determinar a quantidade de ração e água ingeridas e quantidade de urina excretada por cada animal em 24horas. Além disso, na urina foi determinada a concentração de cálcio e fósforo,

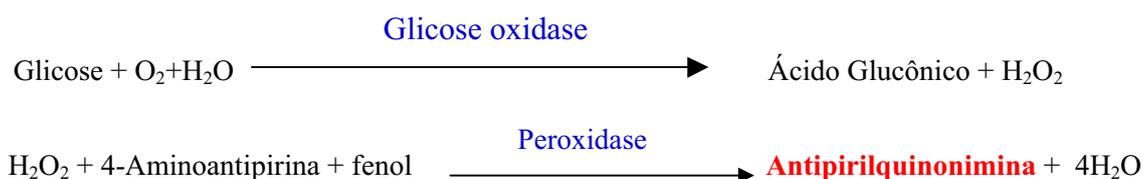
usando o Kit Labtest Diagnóstica[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Antes da realização dos exames bioquímicos, a urina foi acidificada com ácido clorídrico até atingir um pH entre 1 e 3.



FIGURA 21 – Animal na gaiola metabólica para coleta de urina de 24 horas.

4.10.1 Teste de glicemia

O teste da glicose PAP Liquiform é um sistema enzimático para determinação da glicose no sangue em método colorimétrico. O princípio consiste na capacidade da glicose oxidase catalisar a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra⁷.



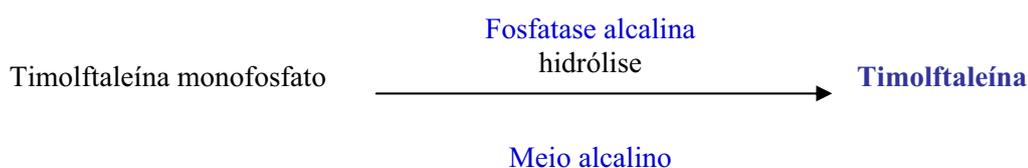
Para o exame foram pipetados 20µl do plasma e 2000µl do reagente; no vortex foi realizado a mistura e colocado em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Foram realizados três exames utilizando o líquido padrão que contém uma concentração conhecida. A leitura do exame foi feita no espectrofotômetro Femto modelo 660 S com 505nm de comprimento de onda.

Para determinação do valor de glicemia em mg/dL é necessário a realização de um cálculo que consiste inicialmente na determinação do fator. O fator é obtido da divisão de 100 que corresponde a concentração de glicose em g/dL no padrão pela média das 3 absorvâncias (leitura dos três tubos padrões).. O fator é multiplicado pelo valor de absorvância resultante de cada amostra.

Para a interpretação dos resultados, ratos diabéticos apresentam valor de glicemia entre 250-600mg/dL e ratos controle entre 120-160 mg/dL.

4.10.2 Teste da Fosfatase Alcalina (ALP)

O teste da ALP foi realizado nas amostras de plasma dos animais pelo método de medição colorimétrico. O princípio consiste na capacidade da ALP presente no plasma hidrolisar a timolftaleína monofosfato, presente no reagente, liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada é azul e diretamente proporcional à atividade enzimática.



A técnica consistiu na mistura de 50µl do substrato e 50µl da solução tampão, provenientes do kit, e foi colocada em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Em seguida foi colocado 50µl da amostra de plasma na mistura e novamente em banho maria a 37°C durante 10 minutos. E finalmente é adicionado 2000µl do reagente de cor na mistura. Foram realizados três exames utilizando o líquido padrão que contém uma concentração conhecida. A leitura do exame foi feita no espectrofotômetro Femto modelo 660 S com 590nm de comprimento de onda.

Para determinação do valor de ALP U/L é necessário a realização de um cálculo que consiste inicialmente na determinação do fator. O fator é obtido da divisão de 45 que corresponde a concentração de ALP em g/dL no padrão pela média das 3 absorbâncias (leitura dos três tubos padrões). O fator é multiplicado pelo valor de absorbância resultante de cada amostra.

4.10.3 Teste de Cálcio (Ca)

O teste de cálcio foi realizado nas amostras de sangue e de urina acidificada pelo método colorimétrico. O princípio consiste no cálcio reagir com a púrpura de ftaleína em meio alcalino formando um complexo de cor violeta.

Cálcio + o-cresolftaleína complexona \longrightarrow **Complexo de ftaleína**

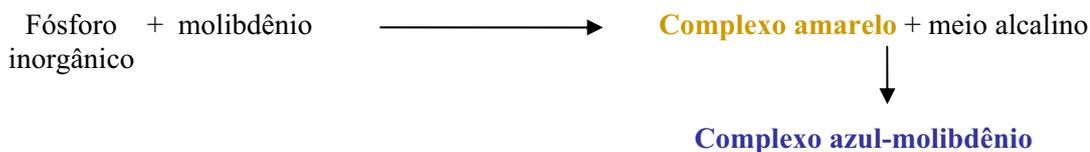
Nesse exame foi feito uma mistura com duas partes do reagente 1 e uma parte do reagente 2. A leitura do exame foi feita no espectrofotômetro com

570nm de comprimento de onda. Foi colocado 1ml da mistura na cubeta do espectrofotômetro, após zerar o aparelho, 20 µl da amostra, sangue ou urina acidificada, foi adicionada na cubeta e então determinado o valor de absorvância. Foram realizados três exames utilizando o líquido padrão que contém uma concentração conhecida. A leitura do exame foi feita no espectrofotômetro Femto modelo 660 S com 570nm de comprimento de onda.

Para determinação do valor de Ca no sangue em mg/dL é necessário a realização de um cálculo que consiste inicialmente na determinação do fator. O fator é obtido da divisão de 10 que corresponde a concentração de Ca em g/dL no padrão pela média das 3 absorvâncias (leitura dos três tubos padrões). O fator é multiplicado pelo valor de absorvância resultante de cada amostra. Para determinação do valor de Ca na urina de 24h, é multiplicado o valor do exame pelo volume da urina e dividido por 100. O resultado do cálcio urinário é expresso em mg/24horas.100g peso corporal.

4.10.4 Teste de Fósforo (P)

O teste de fósforo foi realizado nas amostras de sangue e de urina acidificada (1:10) pelo sistema de reação de ponto final. O princípio consiste na reação dos íons de fosfato da amostra com o molibdênio em meio ácido formando um complexo amarelo, o qual, por ação de um tampão alcalino é reduzido a azul-molibdênio que é medido colorimetricamente.



O exame consistiu na associação de 2000µl de água destilada, 100µl da amostra e 1 gota do catalisador; após a mistura, foi adicionado 1 gota do reagente molibdato; banho de água fria (20-25°C) durante 3 minutos ; adicionar 2 gotas de tampão e colocar em banho de água fria (20-25°C) durante 5 minutos. Foram realizados três exames utilizando o líquido padrão que contém uma concentração conhecida. A leitura do exame foi feita no espectrofotômetro Femto modelo 660 S com 650nm de comprimento de onda.

Para determinação do valor de P no sangue em mg/dL é necessário a realização de um cálculo que consiste inicialmente na determinação do fator. O fator é obtido da divisão de 5 que corresponde a concentração de P em g/dL no padrão pela média das 3 absorbâncias (leitura dos três tubos padrões). O fator é multiplicado pelo valor de absorbância resultante de cada amostra. Para determinação do valor de P na urina de 24h, é multiplicado o valor do exame pelo volume da urina e dividido por 100. O resultado do cálcio urinário é expresso em mg/24horas.100g peso corporal.

4.11 Análise histométrica

4.11.1 Processamento histológico

Após o sacrifício dos animais, as tíbias contendo os implantes, da parte da análise histométrica, foram removidas, os tecidos duros circundantes reduzidos à aproximadamente 1cm do implante e fixadas com formol tamponado neutro a 4% por 48 horas. As peças foram preparadas para cortes não descalcificados de acordo com a técnica proposta por Donath, Breuner²⁰ (1982). Após o processo de fixação foi realizada lavagem com água por 24horas, os espécimes foram desidratados em solução de álcool etílico gradativamente (60%, 80%, 96%, 100%, 100%) durante 1 semana em cada solução.

A infiltração plástica foi feita com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC - Kulzer, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, 30 e 70; 50 e 50; 70 e 30, respectivamente, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro. A peça foi infiltrada no sentido ósseo méso-distal. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados durante 10horas.

O bloco foi removido do molde e montado em uma lâmina acrílica com o auxílio da resina Technovit 4000(Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Por meio da utilização de um sistema de corte (EXAKT Cutting System, Apparetebau GmbH, Hamburgo, Alemanha), foi realizado o corte preliminar e obtida uma secção espessa (300-500 μm). Esta secção foi submetida a um sistema de microdesgaste, que resultou em uma secção de aproximadamente 50 a 70 μm de espessura. As lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina.

4.11.2 Análise histométrica

Primeiramente as lâminas foram codificadas visando não influenciar o examinador durante a análise. Cada lâmina codificada foi analisada uma vez, de forma aleatória pelo mesmo examinador, previamente treinado. Para avaliação do tecido ósseo próximo ao implante, dois parâmetros foram analisados: a) a extensão linear do implante apresentando tecido ósseo em contato com o metal, entre as três espiras iniciais do implante, na mesial e distal (Figura 22); b) área entre as espiras, ocupadas por tecido ósseo, conforme metodologia utilizada por Sennerby et al.⁷⁹ (1992), entre as três espiras iniciais do implante na mesial e distal (Figura 23).

As lâminas histológicas foram visualizadas utilizando-se um microscópio óptico para aumento de 4 vezes (Olympus BX 51). As imagens foram selecionadas e transferidas para um microcomputador (Pentium IV Intel) por meio de uma câmera fotográfica (Olympus CAMEDIA C5060/ wide zoom) acoplada ao microscópio óptico. As imagens foram salvas em formato TIFF. As imagens digitais da lâmina histológica foram importadas para o programa de análise de imagem UTHSCSA – Image tool for windows (version 3.00, Texas, USA). Os dados da extensão linear de contato osso/implante e da área entre as espiras ocupadas por tecido ósseo obtidos em pixels e pixels ao quadrado, respectivamente, foram convertidos para valores de porcentagem.



FIGURA 22 – Representação histométrica da extensão linear de contato entre a superfície do implante e o tecido ósseo.



FIGURA 23 – Representação histométrica da área do tecido ósseo no interior da rosca do implante.

4.12 Análise estatística

Neste estudo, todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

O peso corporal (g) e o volume de urina em 24h (ml) foram analisados com teste ANOVA (análise de variância multivariada) considerando $p < 0,05$. Havendo diferença estatística significativa foi aplicado o teste de Tukey.

As determinações bioquímicas (glicose, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina) apresentaram normalidade dos dados, para comparar os grupos em cada

exame foi aplicado o teste paramétrico ANOVA (análise de variância multivariada) considerando $p < 0,05$. Havendo diferença estatística significativa foi aplicado o teste de Tukey. As mudanças intragrupo ao longo do tempo foram analisadas pelo teste t pareado.

O programa de subtração radiográfica automaticamente determinou a distribuição dos níveis de cinza na RO e RC, os dados para ganho ósseo e perda óssea foram calculados e enviados para banco de dados. A média dos valores da subtração do lado mesial e distal das ROs dos implantes foram usados para comparar os grupos controle 2 meses, controle 4 meses, diabético e insulínico pelo teste ANOVA, considerando $p < 0,05$.

Para a análise histométrica, a média da porcentagem dos dados da extensão linear de contato osso-implante e da área de volume ósseo na mesial e distal das três espiras iniciais do implante foram normais e os grupos foram comparados pelo teste ANOVA (análise de variância multivariada) considerando $p < 0,05$. Havendo diferença estatística significativa foi aplicado o teste de Tukey.

A média dos valores do torque para remoção dos implantes dos grupos não apresentaram normalidade, sendo assim o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) foi usado para comparar os grupos. Havendo diferença estatística significativa foi aplicado o teste de Dunn.

5 Resultado

Para facilitar a leitura, os resultados serão apresentados em duas partes. A primeira parte consiste nos dados dos animais submetidos às análises bioquímica, radiográfica (subtração radiográfica digital) e histométrica pertencentes aos grupos controle histométrico de 2meses (CH 2m); controle histométrico de 4meses (CH 4m); diabético histométrico (DH) e insulínico histométrico (IH) e a segunda parte consiste nos dados obtidos dos animais submetidos ao torque de remoção do implante pertencentes aos grupos controle torque de 2meses (CT 2m); controle torque de 4meses (CT 4m); diabético torque (DT) e insulínico torque (IT) (Anexo 3).

5.1 Resultados da primeira parte

5.1.1 Avaliação clínica

Para avaliar como o DM e a insulino terapia podem influenciar na manutenção da osseointegração, neste estudo foi utilizado um modelo experimental seguro de indução do diabetes com STZ em ratos. Durante o experimento foi observado que os animais não apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento, fato que pode ser observado pela diferença de peso corporal entre os grupos e entre os períodos inicial e final do experimento. Além disso, no

final do experimento, o grupo DH apresentou um peso corporal significativamente menor em relação aos grupos CH4m e IH (Tabela 1). Este fato pode ser observado na Figura 24, a qual mostra um animal diabético e outro controle no momento do sacrifício, é notável a debilidade do animal diabético após 2 meses do DM.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do peso corporal(g) para os diferentes grupos durante o experimento: início; 2 meses e 4 meses

Grupos	Tempo (m)		
	0	2	4
Controle 2m	294±36	411±35	
Controle 4m	276±33	427±38	487±27
Diabético	277±26	393±35	260±51*
Insulínico	283±45	431±47	511±60

* Diferença estatística significante dentro do período ($p < 0,05$)



FIGURA 24 – Ratos no momento do sacrifício com dois meses de diabetes. Note a debilidade do animal diabético (a), quando comparado ao animal controle da mesma idade (b).

Outros sintomas clínicos do DM puderam ser observados neste estudo. O aumento na excreção urinária do grupo DH foi estatisticamente significativo em relação aos grupos CH4m e IH após a indução do DM. No grupo IH houve uma correção da poliúria (Tabela 2). A polifagia e polidipsia também foram observados no grupo diabético. A ingestão de ração, obtido no último exame - antes do sacrifício, no grupo diabético (45 ± 5 g) foi maior que nos demais grupos CH4m e IH, respectivamente, 24 ± 6 g e 26 ± 5 g. Em relação à ingestão de água, o grupo DH ingeriu 200ml de água em 24h enquanto os grupos CH4m e IH ingeriam em torno de 30ml e 50ml, respectivamente. Os valores de ingestão alimentar, tanto de ração quanto de água, foram limitados ao tamanho dos recipientes; após 24h foi possível observar que os animais diabéticos consumiam toda a água e quase toda a ração que era disponibilizada a eles.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da urina excretada em 24horas(ml) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes-exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3 e antes do sacrifício – exame 4)

Grupos	Urina (ml)			
	Exames			
	1	2	3	4
Controle 4m	12,8 \pm 6,1	10,35 \pm 4,1	11,42 \pm 4,1	11,9 \pm 3,7
Diabético	10,5 \pm 3	15 \pm 5	117,88 \pm 30*	130,55 \pm 36*
Insulínico	10,7 \pm 1,8	13,6 \pm 5,5	27,1 \pm 5,6	20,6 \pm 10,8

* Diferença estatística significativa dentro do período ($p < 0,05$)

5.1.2 *Controle glicêmico*

Os níveis de glicemia plasmática estão presentes na Tabela 3. Nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$) nos níveis de glicose plasmática foi encontrada entre os grupos nos exames iniciais (exames 1 e 2). O DM foi induzido com sucesso nos grupos DH e IH, fato determinado pelos níveis hiperglicêmicos ($\geq 300\text{mg/dL}$) significantes em relação ao grupo CH4m (exame 3), no grupo DH este comportamento foi mantido até o final do experimento. Em relação ao grupo IH, houve uma significativa redução dos níveis de glicose plasmática após a administração de insulina (exames 4 e 5). Embora os valores glicêmicos no grupo IH apresentados nos exames 4 e 5 possam ser considerados um quadro de próximos da hipoglicemia (abaixo de 50mg/dL), o estudo piloto (Anexo 2) mostrou que estes valores são restabelecidos durante o dia atingindo níveis glicêmicos normais e níveis hiperglicêmicos próximo ao período de nova administração da insulina.

Tabela 3 – Média e desvio-padrão dos níveis de glicemia plasmática(mg/dL) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 1 dia após a indução do diabetes – exame 3; 20 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exame Grupo	1	2	3	4	5
Controle 2m	137±23	108±17	159±24	-	-
Controle 4m	150±29	109±17	158±23 ^b	125±16	101±20 ^c
Diabético	136±28	99±12	606±64 ^{*ab}	477±56 ^{*abc}	527±61 ^{*ab}
Insulínico	146±21	99±17	613±104 ^{*ab}	48±13 ^{§abc}	42±8 ^{§abc}

*§Diferença estatística significativa entre os grupos no exame (ANOVA, p< 0.05)

^aDiferença estatística significativa intragrupo em relação ao exame1 (teste t pareado, p< 0.05)

^bDiferença estatística significativa intragrupo em relação ao exame2 (teste t pareado, p< 0.05)

^cDiferença estatística significativa intragrupo em relação ao exame3 (teste t pareado, p< 0.05)

^dDiferença estatística significativa intragrupo em relação ao exame4 (teste t pareado, p< 0.05)

5.1.3 Marcadores ósseos plasmáticos e urinários

Neste estudo três marcadores ósseos plasmáticos foram analisados: a fosfatase alcalina (ALP); o cálcio (Ca) e fósforo (P) e dois marcadores urinários: cálcio (Ca) e fósforo (P). A ALP tem função de promover a transferência do grupo fosfato no processo de formação óssea. Quando ocorre a disfunção enzimática da ALP detectada pelo exame de sangue é provavelmente em reflexo a uma disfunção hepatobiliar ou doenças ósseas⁵⁶. Nossos resultados apontaram a ocorrência da disfunção plasmática da ALP no grupo DH, aproximadamente 5 vezes maior, após a indução do DM, e o grupo IH foi capaz de evitar essa disfunção (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos níveis de fosfatase alcalina (U/L) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3; antes do sacrifício – exame 4)

Exame	1	2	3	4
Grupo				
Controle 2 meses	103,82±9,17 A	59,18±11,83 C	-	-
Controle 4 meses	103,21±31,24 A	54,28±13,75 BCDE	41,07±5,78 D	52,43±12,74 BDE
Diabético	106,33±30,61 A	58,89±17,54 A	235,22±89,04 B*	274,11±68,61 B*
Insulínico	101,86 ± 32,03 A	60,29 ± 10,85 BC	65,29± 15,76 BCD	53,29± 22,72 BCDE

*Diferença estatística significativa entre os grupos no exame (ANOVA, $p < 0.05$)

Diferentes letras = diferença estatisticamente significativa entre os exames no mesmo grupo experimentais com $p < 0.05$.

Considerando que Ca e P são elementos químicos com relação direta na mineralização óssea, os níveis desses marcadores ósseos foram determinados no plasma e na urina de 24h. Em relação à determinação do fósforo, não foram observadas grandes variações tanto entre os grupos quanto em relação aos períodos de análise, porém nas duas determinações de fósforo o grupo diabético teve uma quantidade maior que os demais. Esse comportamento do fósforo foi observado no plasma e na urina (Tabelas 5 e 6). Por outro lado, ao analisar o Ca, foi determinado uma excreção significativamente superior do Ca pela urina no grupo diabético em relação ao insulínico e o controle de 4 meses. Esse mesmo resultado não foi observado no nível de Ca plasmático, porque provavelmente o controle hemodinâmico do cálcio, responsável pela vitalidade de órgãos como cérebro e coração não foi afetado pelo diabetes durante o período do experimento (Tabelas 7 e 8).

Tabela 5 - Média e desvio padrão da determinação plasmática de fósforo (mg/dL) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3; 40 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exame	1	2	3	4	5
Grupo					
Controle 2 meses	6,45±1,75	6,15±0,95	5,2±0,99		
Controle 4 meses	6,99±1,72 A	5,87±0,53 ABC	5,58±0,66 BCE	4,33±0,6 CD	4,56±0,97 CDE [#]
Diabético	7,46±1,16 A	5,77±1 ABCD	5,13±0,87 BCD	5,01 ± 0,85 CD	6,53±2,06 ABCD*
Insulínico	6,24± 2,48 A	6,06±1,2 AB	5,44±0,62 AB	4,82 ± 0,66 AB	4±1,37 [#] B

[#]* p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame
Diferentes letras = diferença estatisticamente significativa entre os exames no mesmo grupo experimentais com p<0.05.

Tabela 6 - Média e desvio padrão da determinação de fósforo na urina (mg/dL) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3; 40 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exame	1	2	3	4	5
Grupo					
Controle 2 meses	20,27±7,06 AB	24,79±11,38 A* [#]	14,14±5,26 B		
Controle 4 meses	17,27±8,81 AB	18,01±5,89 AB*	14,03±4,08 AB	12,39±7,62 A*	19,94± 8,68 B
Diabético	15,11± 6,62 A	31,33 ± 14,41 B [#]	17,77± 12,5 AB	27,88±16,29 AB [#]	25,55±6,56 AB
Insulínico	14,57 ± 5,5	27,14 ± 9,34 [#]	14,14 ± 4,14	21,85±12,4 [#]	22,57±9,93

[#]* p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame
Diferentes letras = diferença estatisticamente significativa entre os exames no mesmo grupo experimentais com p<0.05.

Tabela 7 - Média e desvio padrão da determinação plasmática de cálcio (mg/dL) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3; 40 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exame / Grupo	1	2	3	4	5
Controle 2 meses	10,29±0,44	9,83±0,84	9,52±1,21		
Controle 4 meses	9,92±0,38 A	10,04±0,96 AB	9,07±1,49 ABD	10,45±0,92 AC	9±0,73 AD*
Diabético	9,97±0,33 A	10,54±0,76 A	9,02±0,79 BC	10,45±0,75 A	8,32±0,46 C [#]
Insulínico	9,76±0,72 A	9,97±0,7 AB	8,67±0,77 ACD	10,81±0,39 AB	9,21±0,49 ABD*

* p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame

[#] p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame

Diferentes letras = diferença estatisticamente significativa entre os exames no mesmo grupo experimentais com p<0.05.

Tabela 8 - Média e desvio padrão da determinação de cálcio na urina (mg/dL) para os diferentes grupos durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 20 dias após a indução do diabetes – exame 3; 40 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exame / Grupo	1	2	3	4	5
Controle 2 meses	1,32±0,62	1,28±0,47	0,97±0,53		
Controle 4 meses	1,36±0,51 A	0,88±0,42 B	0,91±0,56 ABC	0,59±0,24 BC*	1,11±0,38 AB*
Diabético	1,05±0,42 A	1,16±0,45 A	0,97±0,43 A	10,76±0,61 B [#]	12,2±3,17 B [#]
Insulínico	1,09±0,22	1,41±0,75	1±0,35	1,78±0,58*	2,06±1,16*

* p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame

[#] p<0.05, estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de exame

Diferentes letras = diferença estatisticamente significativa entre os exames no mesmo grupo experimentais com p<0.05.

5.1.4 Análise radiográfica

5.1.4.1 Características radiográficas

Duas observações foram detectadas no exame radiográfico: 1- na imagem radiográfica digitalizada final, de todos os grupos, foi observada a formação de osso ao longo das espiras do implante, principalmente na porção cervical e apical. Isto pode ser explicado pela osteocondução permitida pela camada de óxido de titânio; 2 – as tíbias do grupo DH em geral, apresentavam-se visualmente com espessura menor na imagem radiográfica em relação aos grupos CH4m e IH.

5.1.4.2 Subtração radiográfica digital

Para este estudo foi definido que um desvio padrão (3,68 níveis de cinza) seria considerado como valores de níveis de cinza relacionados às interferências nas imagens radiográficas digitalizadas, este desvio padrão foi determinado pelo histograma de distribuição dos níveis de cinza na região controle (RC). As imagens subtraídas demonstraram que houve uma diferença estatística significativa nos valores de ganho de níveis de cinza entre os grupos DH (122±7) e IH (136±5) (ANOVA, $p < 0,05$) relacionados com a formação óssea ao redor dos implantes, porém não houve diferença significativa entre os grupos CH2m (127±13) e CH4m (133±10) e o grupo IH. Os grupos controles de 2 meses e 4 meses não apresentaram diferenças estatísticas significantes nos níveis de cinza, este resultado sugere que 2 meses pode ser o tempo necessário para osseointegração de implantes neste modelo experimental. O grupo DH mostrou o

menor valor de ganho de densidade óssea, mas não foi diferente estatisticamente dos grupos controles. Estes resultados podem indicar uma tendência do DM em reduzir ou atrasar a formação óssea. Além disso, no grupo IH, o nível de densidade óssea foi mantido em relação ao grupo CH4m (Tabela 9, Figura 25). Para os níveis de cinza relacionados à perda óssea, não houve diferença estatística entre os quatro grupos (Tabela 9, Figura 26).

Tabela 9 – Média e desvio padrão dos níveis de cinza, determinados pela Subtração Radiográfica Digital quantitativa, relacionado ao ganho ósseo e perda óssea nos diferentes grupos

Grupos	Níveis de cinza	
	Ganho	Perda
Controle 2 meses	127 \pm 13	85 \pm 45
Controle 4 meses	133 \pm 10	58 \pm 57
Diabético	122 \pm 7*	86 \pm 39
Insulínico	136 \pm 5*	65 \pm 53

p=0.012 para os níveis de cinza de ganho ósseo

*Diferença significante entre os grupos (p< 0.05)

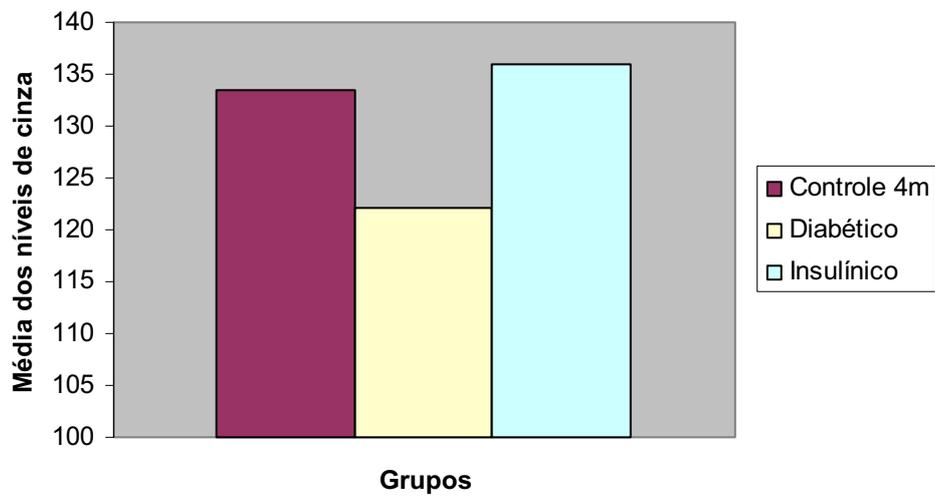


FIGURA 25 – Média dos níveis de cinza determinados pela subtração radiográfica digital quantitativa relacionada com ganho ósseo nos diferentes grupos.

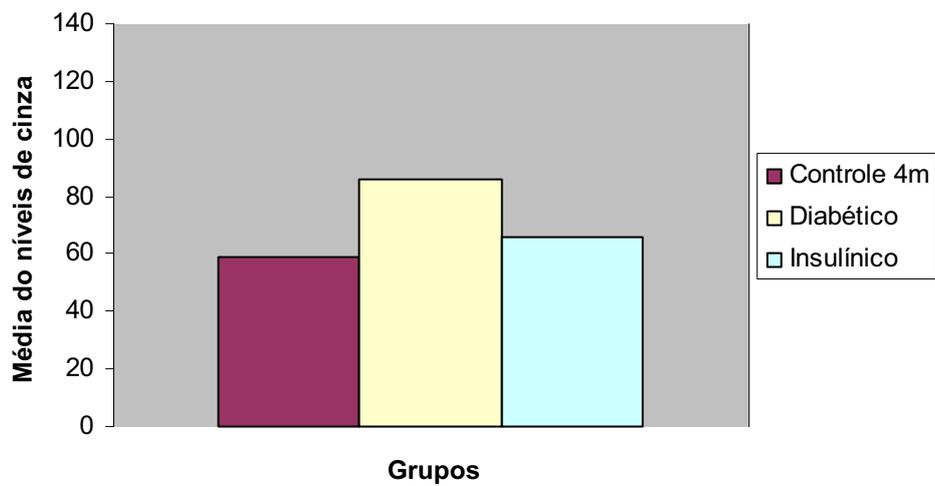


FIGURA 26 – Média dos níveis de cinza determinados pela subtração radiográfica digital quantitativa relacionada com perda óssea nos diferentes grupos.

5.1.5 Histometria

5.1.5.1 Extensão linear de contato osso-implante

Os resultados histométricos em relação à extensão linear de contato osso-implante mostraram que o tempo influenciou positivamente no contato osso-implante, determinado pela superioridade significativa do grupo CH4m em relação ao grupo CH2m. No grupo DH, o contato entre osso-implante foi maior que no grupo CH2m, mas com ausência de diferença estatística significativa. Em adição a esses resultados, foi observado que no grupo insulínico o contato entre osso e implante manteve-se semelhante ao grupo CH4m e estatisticamente superior ao grupo CH2m. Ao observar o período de 4 meses, a porcentagem de contato osso-implante não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos estudados, porém o grupo DH mostrou o menor valor indicando provavelmente um *turnover* ósseo mais lento em relação aos grupos IH e CH4m (Tabela 10, Figura 27).

Tabela 10 – Média e desvio padrão da porcentagem de contato entre osso e implante nos diferentes grupos

Grupos	Contato osso-implante (%)
Controle 2m	53,93±9,31
Controle 4m	63,37±5,88*
Diabético	60,80±6,83
Insulínico	66,97±4,13*

ANOVA, p=0.014985

*Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo C2m (p< 0.05)

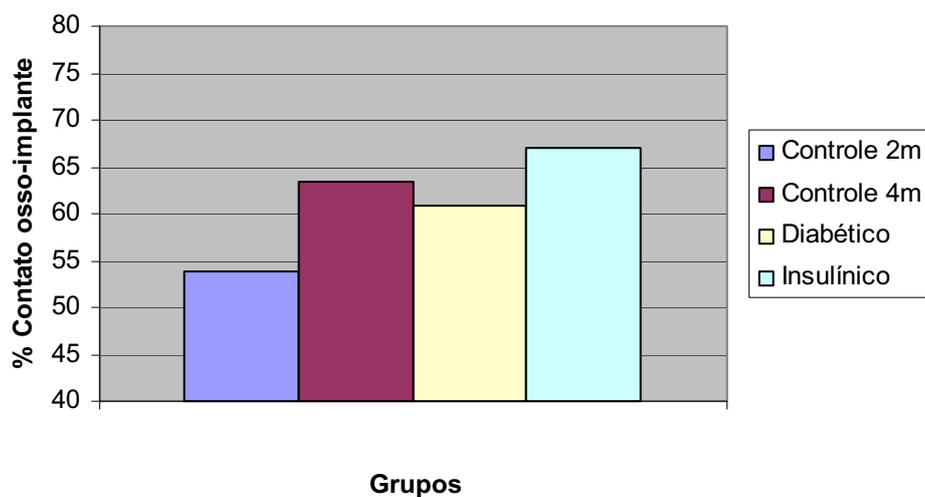


FIGURA 27 – Média da porcentagem de contato entre osso-implante nos diferentes grupos.

5.1.5.2 Área óssea

A média da porcentagem da área óssea entre as três espiras iniciais mesial e distal do implante no grupo DH ($69,34 \pm 5$) foi significativamente menor em relação aos demais grupos (CH4m: $78,2 \pm 5,5$ e IH: $79,63 \pm 5,2$) considerando o mesmo período de estudo (4 meses). Quando se analisou a influência do tempo foi possível observar um pequeno aumento da área óssea, nos grupos CH4m e IH em relação ao grupo CH2m, mas sem apresentar diferenças estatísticas significantes. No grupo DH, este fato não foi observado, houve uma pequena redução da área óssea do que no CH2m (Tabela 11, Figura 28).

Tabela 11 – Média e desvio padrão da porcentagem de área óssea nos diferentes grupos

Grupos	Área óssea (%)
Controle 2m	73,65 ± 4,31
Controle 4m	78,2 ± 5,5*
Diabético	69,34 ± 5
Insulínico	79,63 ± 5,27*

ANOVA, p=0.0005518

* Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo D (p< 0.05)

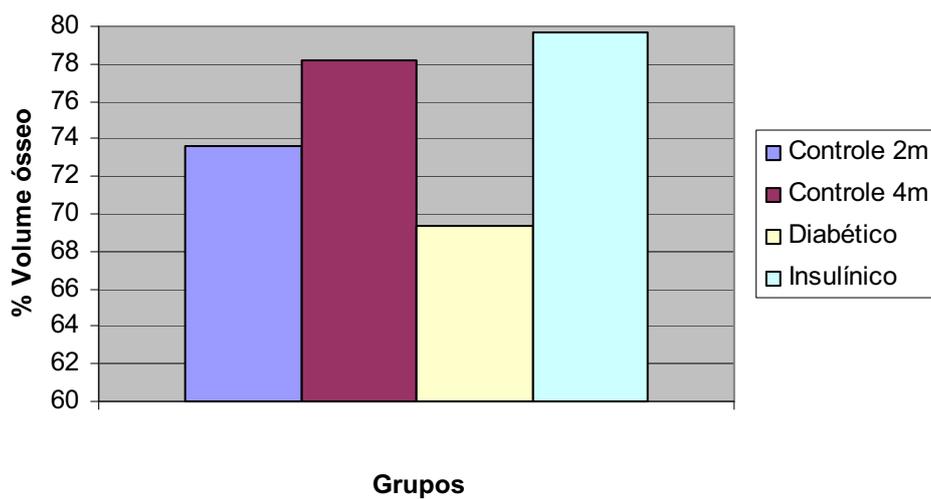


FIGURA 28 – Média da porcentagem de área óssea nos diferentes grupos.

5.1.5.3 *Observações histológicas*

As Figuras 29 até 39 mostram imagens das lâminas histológicas, dos grupos pertencentes ao estudo.

Neste estudo, os implantes podem ser considerados osseointegrados, pois em todos os grupos foi observado o contato direto, parcial ou total, entre o osso e o implante. Histologicamente, a osseointegração é determinada por uma aparente inserção direta entre o osso vital e a superfície do implante sem interposição de tecido conjuntivo.

Neste modelo experimental, a tíbia dos ratos possui duas corticais ósseas, superior e inferior, e uma medula óssea interposta. Na cortical óssea superior era visível a remodelação óssea próxima à região do implante em todos os grupos. No grupo CH2m havia menor preenchimento ósseo entre as espiras e menor contato entre o osso e o implante interposto por tecido de granulação. Porém, no período de 4 meses, a presença de um maior preenchimento ósseo entre as espiras do implante e o aumento de contato entre o osso e o implante foram evidentes, principalmente para os grupos CH4m e IH. O preenchimento ósseo no grupo DH apresentou diferenças em relação aos demais grupos. Houve um aumento do preenchimento ósseo entre as espiras do implante, no grupo DH em relação ao grupo CH2m, porém o osso no grupo diabético era menos compacto em relação aos grupos CH4m e IH, ou seja, havia espaços com tecido conjuntivo interposto no tecido ósseo.

Na porção medular, principalmente nos grupos de 4 meses foi observado uma formação óssea entre as espiras, provavelmente pelo estímulo

ostecondutor da camada de óxido do implante e também por fragmentos ósseos deslocados durante a instalação do implante e remodelados no espaço medular.

Na cortical óssea inferior, foi observado um extenso contato osso-implante, assim como a presença de um osso mineralizado e compacto, em todos os grupos (CH2m, CH4m, D e I). Provavelmente, os danos ósseos causados pelo procedimento cirúrgico são menores na cortical óssea inferior

Início do implante

Final do implante

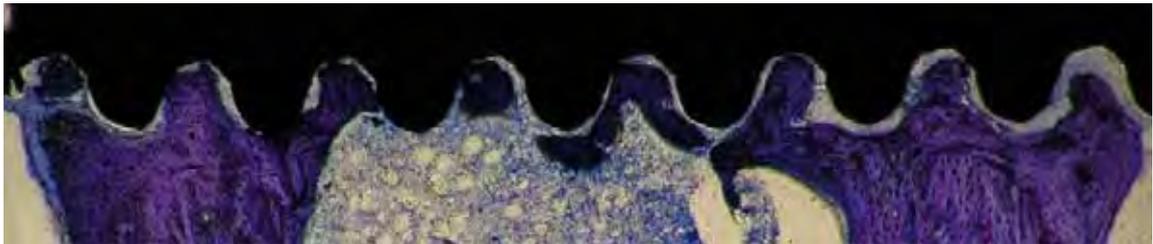


FIGURA 29 - Visão geral do implante do grupo C2m, mostrando as corticais superior e inferior e o espaço medular. Aumento 4x, coloração azul de toluidina.

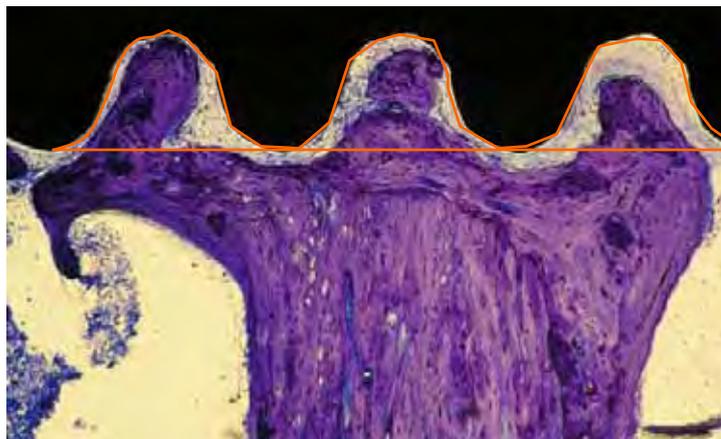


FIGURA 30- A área analisada corresponde a porcentagem de osso entre as três espiras iniciais do implante na mesial e distal. Osso entre as espiras do implante no grupo C2m. O osso não preenche todo o espaço da espira e há tecido de granulação interposto entre osso e implante. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.

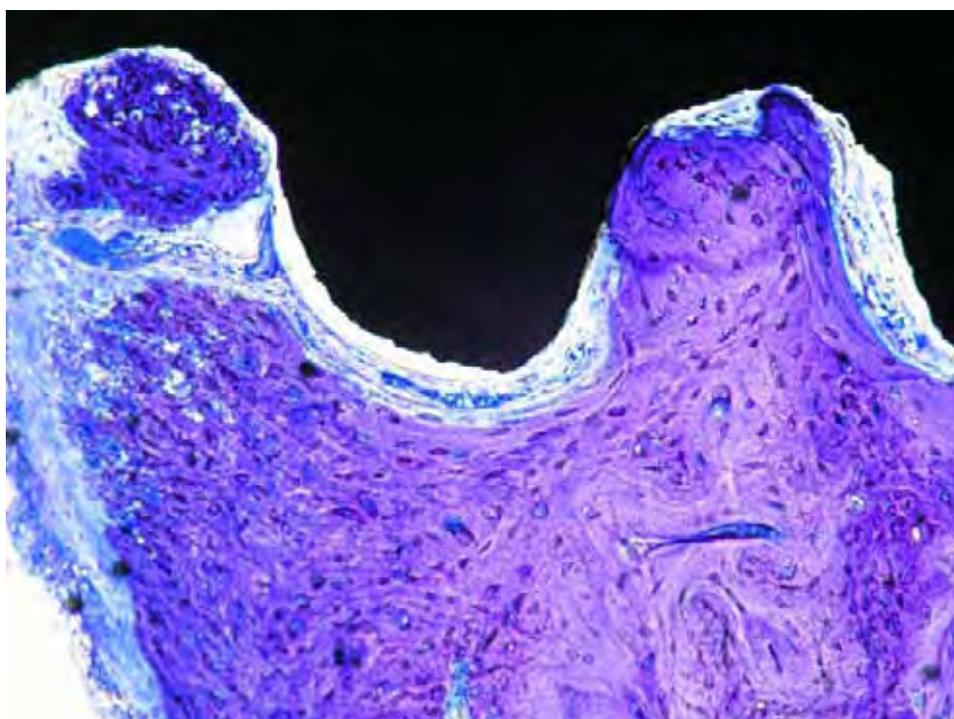


FIGURA 31 - Imagem ampliada do osso na espira do implante no grupo C2m. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.



FIGURA 32 - Osso nas três espiras cervicais do implante no grupo C4m. Maior preenchimento ósseo das espiras e o maior contato do osso com o implante. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.

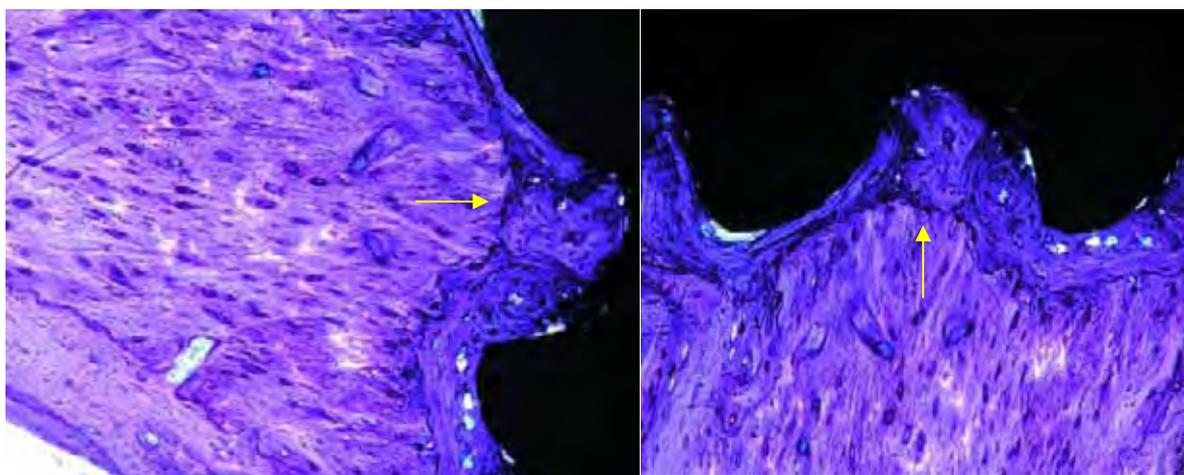


FIGURA 33 – Imagem ampliada do osso na cortical superior do grupo C4m, mostrando o remodelamento ósseo. É possível observar a linha de divisão entre o osso pré-existente e o osso neoformado. Aumento 20x, coloração azul de toluidina.

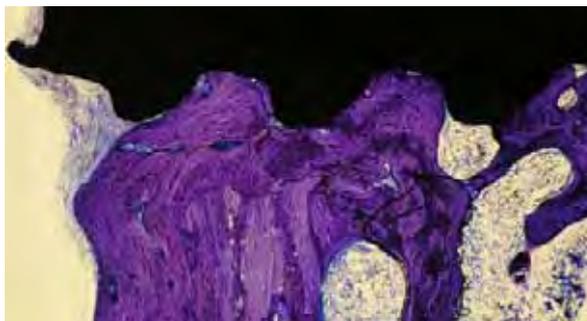


FIGURA 34 - Osso nas espiras cervicais do implante no grupo D. O preenchimento ósseo das espiras e o contato do osso com o implante. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.

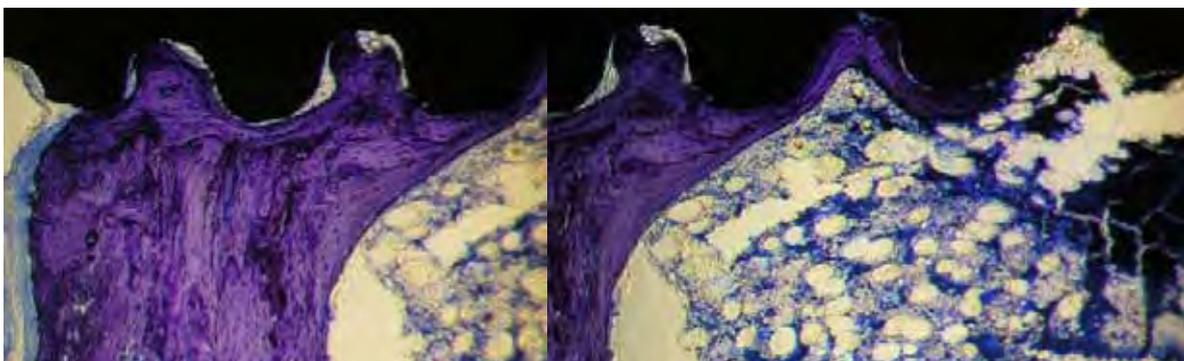


FIGURA 35 - Osso nas espiras cervicais do implante no grupo D preenchimento ósseo das espiras e o contato do osso com o implante. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.

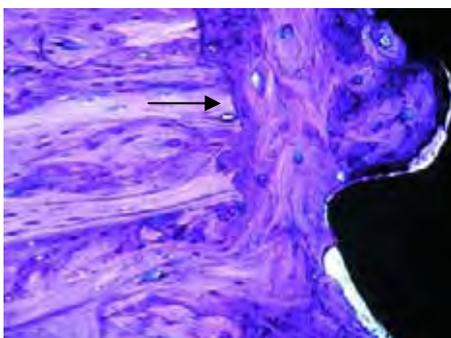


FIGURA 36 - Imagem ampliada da cortical óssea superior no grupo D, mostrando o remodelamento ósseo. É possível observar a linha de divisão entre o osso pré-existente e o osso neoformado. Aumento 20x, coloração azul de toluidina.

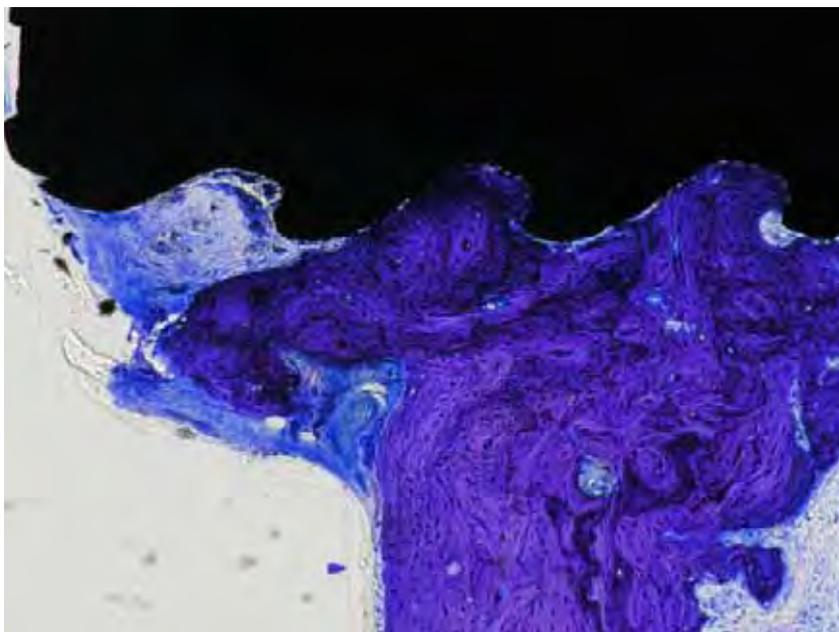


FIGURA 37 - Osso nas espiras cervicais do implante no grupo I. Preenchimento ósseo das espiras e o contato do osso com o implante. Aumento 10x, coloração azul de toluidina.

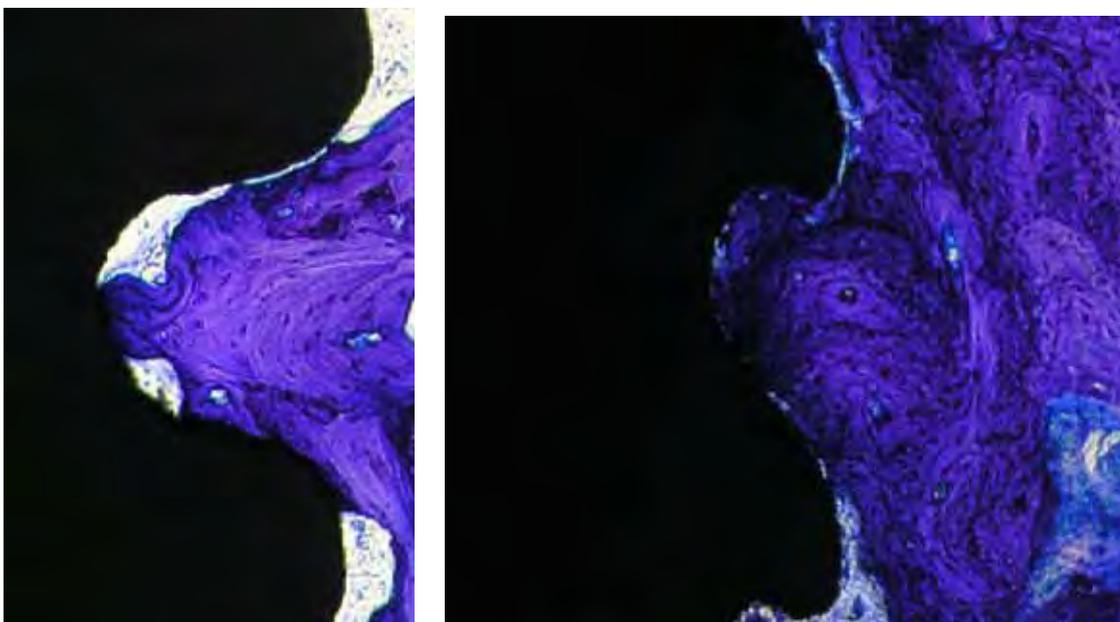


FIGURA 38- Preenchimento ósseo das espiras do implante e o contato do osso com o implante no grupo I. Aumento 20x, coloração azul de toluidina.

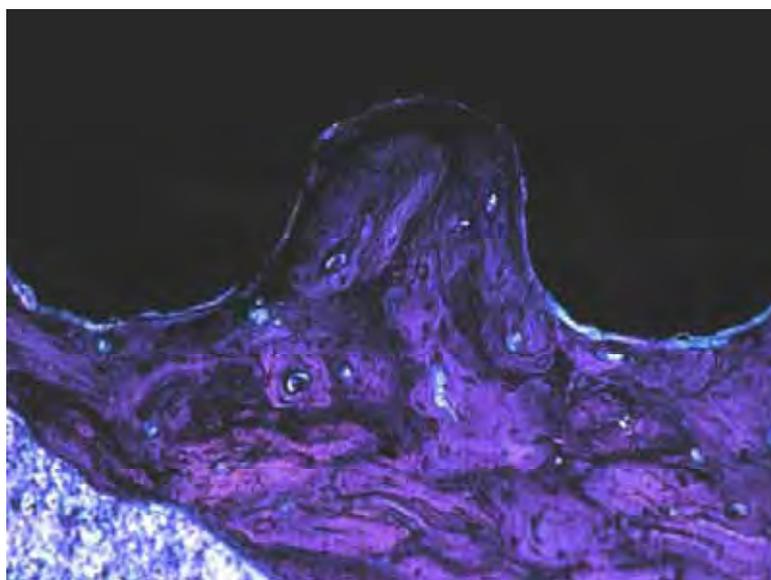


FIGURA 39 – O completo preenchimento ósseo da espira do implante contendo osso compacto e mineralizado no grupo I. Aumento 20x, coloração azul de toluidina.

5.2 Resultados da segunda parte

A segunda parte consiste nos dados obtidos dos animais submetidos à análise de torque de remoção do implante, pertencentes aos grupos controle torque de 2 meses (CT 2m); controle torque de 4 meses (CT 4m); diabético torque (DT) e insulínico torque (IT).

5.2.1 Avaliação clínica e controle glicêmico

Durante os 2 meses da cirurgia de instalação dos implantes, os implantes de todos os grupos apresentaram uma cicatrização adequada, com ausência de perda de implante e de infecção durante esse período. Porém, após o período de 2 meses do *Diabetes Mellitus*, os animais do grupo DT (inicial - $302,77g \pm 22,80g$; final - $299,77g \pm 55,80g$) apresentaram um peso corporal consideravelmente menor em relação aos grupos CT4m (inicial - $320,28g \pm 34,64g$; final - $517,64g \pm 36,84g$) e IT (inicial - $333,71g \pm 22,10g$; final - $528,71g \pm 23,60g$).

A Tabela 12 apresenta os níveis glicêmicos nos grupos controle 2 meses, controle 4 meses, diabético e insulínico em 5 exames. O grupo DT apresentou níveis glicêmicos elevados (hiperglicemia) estatisticamente significantes durante o período experimental do *Diabetes Mellitus* em relação aos grupos CT4m e IT.

Tabela 12 - Média e desvio padrão da determinação plasmática de glicemia nos grupos (controle 2 meses, controle 4 meses, diabético e insulínico) durante o experimento (antes da cirurgia de instalação dos implantes –exame 1; antes da indução do diabetes – exame 2; 1 dia após a indução do diabetes – exame 3; 40 dias após a indução do diabetes – exame 4 e antes do sacrifício – exame 5)

Exames Grupos	1	2	3	4	5
Controle 2m	134±12 A	108±15 B			
Controle 4 m	136±16 A	110± 10 BC	106±13 CD [§]	93,5±16 D [§]	127±14 AB [§]
Diabético	127±17 A	107±27 A	510±34 B*	422±45 C*	494±58 BD*
Insulínico	135±9 A	121±20 A	450±25 B [#]	64±6 BC [#]	75±11 BCD [#]

*^{# §} p<0,05, estatisticamente significante entre os grupos no exame

Diferentes letras = diferença estatisticamente significante entre os exames no mesmo grupo experimental com p<0,05.

5.2.2 Torque de remoção do implante

O torque de remoção do implante foi comprometido pelo DM. Este fato pode ser observado, pela média do torque de remoção do implante no grupo DT (12,9±2,5 N.cm) ser significativamente menor em relação ao grupo IT (17,1±3 N.cm) (p<0.05), porém sem diferenças significativas com os grupos CT2m (13,1±2,6 N.cm) e CT4m (16,9±5,3 N.cm). No grupo IT observou-se uma recuperação dos valores do torque de remoção do implante, sendo este semelhante ao CT4m e significativamente superior ao CT2m (Tabela 13). Observe na Figura 40 que os valores do torque de remoção foram semelhantes entre os grupos CT4m e IT e superiores em relação aos demais grupos. O valor do torque de remoção do

implante no grupo DT foi inferior aos grupos CT4m e IT e muito próximo ao valor do grupo CT2m.

Tabela 13- Média e desvio padrão dos valores do torque de remoção do implante nos diferentes grupos

Grupos	Torque de remoção (N.cm)
Controle2m	13,1±2,6
Controle4m	16,9±5,3
Diabético	12,9±2,5
Insulínico	17,1±3* ^{&}

*Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo D ($p < 0.05$)

[&]Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo C2m ($p < 0.05$)

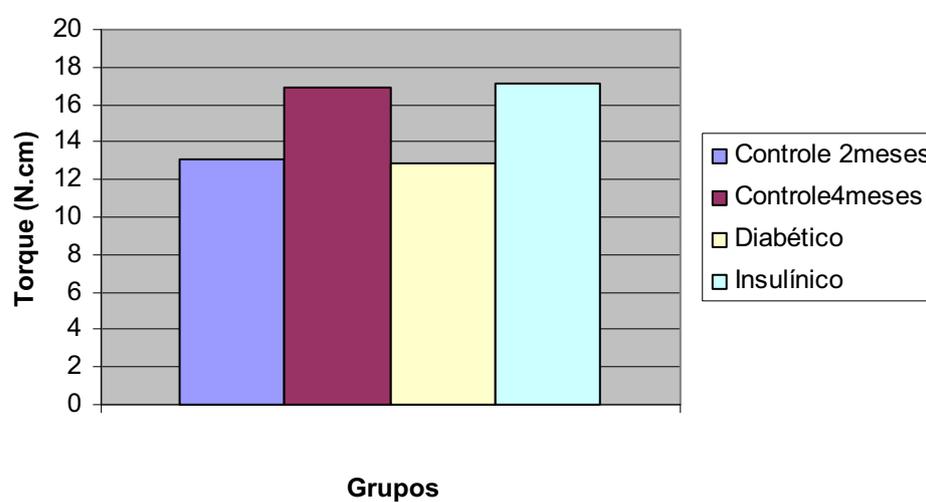


FIGURA 40 – Média do torque de remoção do implante nos grupos.

6 *Discussão*

O efeito do *Diabetes Mellitus* e da insulino-terapia nos implantes dentais tem sido estudado nos anos recentes, porque essa doença pode prejudicar a qualidade óssea^{42,58,82}. Os resultados desta investigação indicam que o diabetes tem uma tendência a prejudicar o osso ao redor dos implantes já osseointegrados e a insulina é capaz de manter a estabilidade da osseointegração.

Para este estudo foi utilizado o rato como modelo experimental, pela possibilidade de se trabalhar com um número maior de animais e são animais de fácil manuseio. Além disso, é o animal mais utilizado no estudo de diabetes, com a vantagem de usar menor quantidade de droga na indução e facilitar a reposição de animais, pois a perda é comum após a indução, devido à severidade da ação da estreptozotocina⁹⁵. Neste estudo houve um índice de morte de 35%, aproximadamente, até três dias após a indução, semelhante aos resultados de Shires et al.⁸⁰ (1981). Após esse período crítico, os animais diabéticos suportaram o período de 2 meses correspondentes à duração do experimento. E finalmente, é o modelo experimental mais utilizado na avaliação da osseointegração de implantes em grupos diabéticos^{24,51,58,62} facilitando assim a comparação dos resultados.

Este estudo foi realizado em duas fases, devido à limitação do espaço, não havia acomodação na gaiola metabólica para os animais e pela dificuldade de manipulação de muitos animais ao mesmo tempo, inviabilizando a

coleta de sangue e aplicação das drogas no horário correto. A primeira fase correspondeu aos procedimentos com animais do torque, nesse momento ocorreram dois eventos: o primeiro foi a morte de 50% dos animais após a indução e o segundo foi a perda de 60% dos animais do grupo insulínico na gaiola metabólica, após a indução de diabetes. O primeiro evento ocorreu, provavelmente, devido a uma parte dos animais serem menos resistentes e não suportarem a quantidade de insulina liberada pelas células β , que estavam estocadas no momento da degradação da célula, logo após a indução por STZ, causando hipoglicemia grave até coma, este processo foi observado durante três dias após a indução do DM. O segundo evento ocorreu porque os animais não conseguiram chegar ao recipiente de ração devido ao tamanho dos animais, este fato foi observado porque os animais apresentaram ferimento no focinho e o problema foi resolvido aumentando a largura do recipiente.

Na segunda fase que corresponde aos procedimentos com os animais para análise histológica, após a indução do DM houve a morte de 3 animais entre 15. Semelhante a estes resultados, o estudo de Shires et al.⁸⁰ (1981) tiveram morte de 4 animais em 15, nas 72h após a indução. Houve a perda de 3 animais do grupo insulínico.

Os grupos são constituídos por uma amostra contendo 10 animais, porém sempre foram induzidos 15 animais para os grupos diabéticos e insulínicos por causa das mortes e para eliminar animais que tivessem valores discrepantes.

O reparo ósseo nesse modelo experimental apresenta uma diferença em relação a origem do osso, ossos longos têm origem endocondral e os

ossos da maxila e da mandíbula têm origem intramembranosa⁵⁸. Porém, após uma intervenção cirúrgica no osso da cavidade bucal ou em ossos longos ocorre a reparação nos dois tipos ósseos. Portanto, os resultados obtidos nessa investigação com implantes instalados na metáfise tibial de ratos podem ser inferidos para os implantes dentais para análise de reparação óssea.

Em ordem a avaliar a osseointegração antes da presença do DM foi incluído nesse estudo o grupo controle 2 meses (C2m). Após dois meses da instalação do implante, todos os implantes foram considerados osseointegrados pelas análises radiográfica e/ou pelo torque de remoção do implante. Não houve nesse período casos de fratura óssea, presença de abscesso ou perda de implante.

A concentração de STZ de 40mg/kg foi capaz de induzir o DM nos ratos *Wistar* com 5 meses de idade, pois os animais apresentaram hiperglicemia e outras características clínicas da doença como perda de peso, polifagia, poliúria e polidipsia, logo após a indução e ao longo dos dois meses do experimento como observado nos exames 3 do controle glicêmico, havendo ainda uma manutenção da hiperglicemia sem haver a perda dos animais. Ao contrário dos resultados de Wong, Wu¹⁰¹ (1994) que determinaram a dose de 60mg STZ/kg a mais adequada para obtenção do DM em ratos *Lewis* com 2 meses de idade. Esses autores determinaram que a dose de 40mg STZ/Kg era insuficiente para gerar um diabetes inicial rigoroso, nosso estudo piloto também evidenciou esta condição porém o diabetes tornou-se rigoroso durante a avaliação, e os resultados dos exames glicêmicos, no nosso experimento, nas Tabelas 3 e 12 mostraram um valor hiperglicêmico logo após a indução. Portanto, o fato de ocorrer variação dos

níveis glicêmicos imediatamente após a indução utilizando a mesma concentração da droga, possa ser explicado por diferença na linhagem e raça dos animais, assim como na idade e no peso dos animais. No estudo piloto, a indução com a concentração de 60mg STZ/kg causou morte de todos os animais.

Em relação aos dados bioquímicos este estudo mostrou um evidente aumento da ALP e da excreção urinária de cálcio e um aumento discreto da excreção urinária do fósforo do grupo D em relação ao grupo C4m após o diabetes, e esses valores são semelhantes aos resultados apresentados por Goodman, Hori²⁸ (1984), Shires et al.⁸⁰ (1981) e Ward et al.⁹⁴ (2001). Embora Goodman, Hori²⁸ (1984) tenham determinado não haver relação dos resultados bioquímicos com a osteopenia, provavelmente justificado pelo fato que o período de acompanhamento foi de curta duração (10 dias), o nosso estudo avaliou o Diabetes por um tempo mais prolongado, e a manutenção dessas alterações bioquímicas nos faz concordar com Ward et al.⁹⁴ (2001) que relataram a ocorrência de uma deficiência renal gerando um desequilíbrio na excreção de Ca^{+2} e de P^+ , além disso, a ALP plasmática evidencia um metabolismo ósseo alterado. A ALP neste estudo foi 5x maior que no grupo controle 4 meses. Portanto, nós consideramos que ao longo do tempo as alterações bioquímicas evidenciadas no diabetes podem estar associadas a uma osteopenia.

Os resultados de hipercalcúria nos animais diabéticos estão de acordo com as fortes evidências que demonstram que o diabetes causa uma hipercalcúria e reduzida massa óssea^{28,81,94}. Ward et al.⁹⁴ (2001) comprovaram uma excreção tubular renal de Ca^{+2} aumentada e os níveis plasmáticos de Ca^{+2}

mantidos em ratos com diabetes por STZ. Os autores consideram o cálcio, o eletrólito mais excretado nos animais diabéticos não podendo apenas ocorrer devido difusão osmótica, ou seja, provavelmente o DM age no cálcio renal e na calcificação óssea. Porém no sangue, os níveis de cálcio não são alterados. Este achado poderia ser explicado pelo controle hemodinâmico do cálcio, responsável pela vitalidade de órgãos como cérebro e coração não serem afetados pelo diabetes durante o período do experimento, porém com o passar do tempo e os danos do diabetes aumentarem, o controle hemodinâmico possa apresentar desequilíbrio. Esses achados estão de acordo com outros estudos da literatura^{28,80,94}.

Neste estudo foram utilizadas as análises histométricas do contato entre osso-implante e da área óssea entre as espiras do implante por serem formas de análise usadas em estudos com animais sadios ou comprometidos sistemicamente^{11,67,80} para avaliar a osseointegração. As duas análises foram realizadas na área óssea das três espiras cervicais do implante, mesial e distal, a área foi determinada por três razões: região contendo osso cortical; região óssea mais lesada na cirurgia e região óssea avaliada na subtração radiográfica digital permitindo uma comparação dos resultados.

Os resultados histométricos mostraram que o grupo D teve menor porcentagem de preenchimento de osso entre as espiras do implante (volume ósseo) de forma significativa e menor contato entre o osso e o implante em relação aos grupos C4m e I. Esse efeito deletério observado nos animais diabéticos pode ter ocorrido porque o DM prejudica a reparação óssea¹⁷

promovendo redução da formação de matriz óssea⁸⁴; alterando a síntese protéica³⁰; aumentando o tempo necessário para mineralização da matriz osteoide²⁵; reduzindo o turnover ósseo⁸¹; diminuindo a expressão dos fatores de transcrição que regulam a diferenciação osteoblástica⁴⁷, o número de osteoblastos e osteoclastos; produzindo alterações metabólicas¹⁹; e provocando redução na produção de colágeno⁷⁴ e osteocalcina¹⁹. Tais alterações adquirem maior severidade com o passar do tempo⁴⁸, talvez pelo acúmulo dos produtos da glicosilação (AGEs)⁷¹. Esses fatores podem justificar o comprometimento ósseo ao redor de implantes em animais diabéticos^{24,48} como foi observado neste estudo. Porém nossos achados apresentam menor intensidade dos parâmetros observados, provavelmente porque foi avaliado o osso que já havia cicatrizado por certo período livre de influências como o DM e a insulino-terapia, introduzidas após 60 dias de osseointegração, diferentemente da maioria dos estudos que analisaram a influência da doença e do tratamento no início da osseointegração. Os achados histológicos em relação ao contato entre osso e implante no osso cortical superior são parecidos aos de Know et al.⁴³ (2005) que tiveram diferença estatisticamente significativa no contato entre osso e implante medular, a partir de dois meses entre os grupos diabético e insulínico, porém as análises foram feitas em áreas ósseas diferentes e sabe-se que o DM exerce maior influência no tecido ósseo medular.

Avaliando a porcentagem do volume ósseo e do contato osso-implante nos animais diabéticos, podemos determinar que o DM não inviabilizou a formação e mineralização óssea, apenas os eventos ósseos foram mais lentos em relação aos demais grupos. Esses achados poderiam ser explicados pelo fato que

ratos diabéticos continuam a formar osso novo, mas em menor quantidade, já a maturação osteóide e a mineralização ocorrem de forma mais lenta e proporcional à quantidade de formação óssea existente²⁸. O *turnover* ósseo lento, evidenciado nos artigos de Devlin et al.¹⁷ 1996, Dixit et al.¹⁹ 1987, Follak et al.²⁵ 2004, Goodman, Hori²⁸ 1984, Lu et al.⁴⁷ 2003, Grandini et al.³⁰ 1990, Shyng et al.⁸¹ 2001, Spanheimer et al.⁸⁴ 1988, provavelmente também pode ter contribuído para a hipercalciúria observada nos ratos diabéticos. Shires et al.⁸⁰ (1981) determinaram que embora ocorresse a absorção do cálcio no intestino, o esqueleto não consegue manter o reservatório de cálcio acabando por eliminar pela urina, em adição a supressão da função da paratireóide, hipercorticosteronismo e um efeito solvente da glicosúria são prováveis para o aumento da excreção do cálcio, é improvável que hipercalciúria ocorra apenas por nefrotoxicidade pelo DM induzida.

Considerando as afirmativas que a redução da formação óssea em diabéticos está relacionada com a redução do número de osteoblastos⁸¹ que continuam funcionando normalmente²⁸, porém esta condição em longo prazo pode levar a distúrbios no metabolismo do colágeno e/ou à calcificação tornando-se evidente no osso diabético. Podemos esperar que os resultados encontrados neste trabalho possam ser agravados em estudos experimentais mais longos.

Em relação à área óssea, a literatura demonstra resultados controversos. A formação óssea foi prejudicada nos animais diabéticos quando comparados aos sadios no estudo de Takeshita et al.⁸⁷ (1997). Já no estudo de Nevins et al.⁵⁸ (1998), foram observados resultados semelhantes para a área óssea

e, no estudo de McCracken et al.⁵² (2006) os resultados obtidos foram maiores aos 14 dias e menores aos 28 dias quando comparados aos animais sadios, porém o diabético teve maior formação óssea. Um dos aspectos relatados na literatura é que a taxa elevada de glicose sanguínea apresenta um efeito negativo sobre a osseointegração^{27,48,51,58,82} e nossos resultados estão condizentes com esta afirmativa.

Outro aspecto que pode dar diferenças entre os estudos é a área do osso analisada, o nosso estudos avaliou as três espiras cervicais, Margonar⁴⁵ (2005) avaliou a segunda rosca do implante tendo resultados menos variáveis, pois sempre estava em contato com osso. Gerritsen et al.²⁶ (2000) avaliaram osso ao redor de todo o implante e teve muita variabilidade de resultados.

Enfim, a influência deletéria do DM na osseointegração tem sido demonstrada em modelos diabéticos experimentais. Os resultados histológicos deste estudo estão de acordo com autores que sugerem que o DM pode ser associado com uma reduzida formação óssea ao redor de implantes e uma incompleta e atrasada resposta na reparação óssea do implante inserido⁴². Outra informação foi que a nova formação óssea ao redor dos implantes foi imatura e menos organizada em ratos diabéticos sem controle em relação aos ratos não diabéticos^{51-52,58,62}. Margonar et al.⁴⁹ (2003) também reportaram um menor valor para o torque de remoção em animais diabéticos e esta observação parece ser tempo-dependente.

Estudos apresentados na literatura demonstram que a administração de insulina é capaz de restaurar os níveis glicêmicos e corrigir algumas das alterações ósseas provocadas pelo *Diabetes Mellitus*^{17,25,81}. Este estudo está em concordância com esses achados, pois, com a administração de insulina os níveis glicêmicos foram restabelecidos e em todas as análises realizadas no experimento (radiográfica, bioquímica, do torque de remoção e histométrica) os resultados do grupo insulínico foram similares ao grupo controle de 4 meses. Também foi observado um ganho ósseo ao longo do tempo, pois os valores das análises do grupo insulínico foram superiores em relação ao C2m. Nós poderíamos assumir que neste modelo experimental não foram detectados diferenças na osseointegração do grupo insulínico devido ao fato da administração de insulina e ao fato da osseointegração ter ocorrido sem influências de doenças, provavelmente dois dias do DM sem controle, não chegou a causar danos irreversíveis ao organismo dos animais.

Além disso, a insulino terapia, neste estudo mostrou resultados positivos evidenciando a obtenção do controle metabólico desses animais, este fato pode ser explicado pela realização do estudo piloto prévio, padronizando adequadamente a dose de insulina de forma que o animal permanecesse grande parte do tempo com níveis de glicose normais, porque é evidente nos artigos a determinação dos níveis de glicemia plasmática mais altos^{28,48-49} mostrando que não houve um controle glicêmico adequado dos animais, talvez pela dose de insulina ou pela quantidade de administração. Outro fato é que a insulino terapia foi iniciada dois dias após a indução e provavelmente a doença não havia causado

danos irreversíveis aos animais. Porque a perpetuação do DM pode causar danos sistêmicos, reversíveis ou irreversíveis ao organismo e um tratamento insulínico tardio pode retificar parcialmente os danos, como mostrado por Hoskins, Scott³⁵ (1984) que não tiveram recuperação total dos danos renais com administração de insulina.

Reforçando essas informações, McCracken et al.⁵² (2006) relatam que as alterações ósseas em animais insulínicos poderiam ser influenciadas por mais fatores, além dos níveis glicêmicos e talvez as alterações sejam provenientes da indução por STZ já que Siqueira et al.⁸² (2003) mostraram resultados entre os grupos de insulina e controle iguais e os animais foram induzidos com aloxana. Com os achados deste estudo, nós não concordamos com esta afirmativa, pois os animais deste trabalho foram induzidos com STZ e apresentaram resultados similares ao de Siqueira et al.⁸² (2003), provavelmente esta condição está vinculada ao início do tratamento insulínico e à manutenção do controle glicêmico, evitando a ocorrência de danos irreversíveis ao organismo pelo diabetes do que ao tipo de droga utilizada na indução.

Os resultados histométricos mostraram que a densidade óssea e o contato osso-implante nos animais insulínicos foram semelhantes ao controle. Também, Siqueira et al.⁸² (2003) encontraram resultados similares com relação à formação óssea ao redor dos implantes em animais tratados com insulina quando comparados aos sadios. Todavia, Fiorellini et al.²⁴ (1999) apresentaram recuperação na densidade óssea, porém o contato osso-implante permaneceu menor em relação ao animal sadio. Da mesma forma, Margonar⁴⁸ (2005) mostrou

que a terapia insulínica não foi capaz de melhorar os valores de contato entre osso e implante.

Portanto, podemos resumir que os resultados histométricos deste estudo mostraram que após dois meses de reparação óssea após indução do DM, houve uma tendência de reduzir a densidade óssea ao redor dos implantes dentais na presença do DM. Por outro lado, a insulino-terapia foi capaz de manter a densidade óssea similar nos ratos insulínicos quando comparados aos ratos sem doença.

Observações semelhantes, mas com significâncias estatísticas diferentes, foram apresentadas com a subtração radiográfica digital (SRD). Neste estudo, a SRD realizada com as radiografias contendo o osso ao redor de implantes em ratos diabéticos mostrou uma densidade óssea reduzida comparada com os ratos insulínicos, determinada por uma média dos valores de níveis de cinza menor no grupo D. Em adição, o grupo diabético apresentou o maior valor de perda óssea. A associação entre o menor valor de ganho e o maior valor de perda pode ser interpretada como menor conteúdo mineral no grupo diabético como definido por Christgau et al.¹³ (1998). Nossos achados estão de acordo com Kwon et al.⁴³ (2005), que reportaram o comprometimento da manutenção da osseointegração nos implantes dentais nos ratos diabéticos, porém com redução no contato entre o osso e o implante ao longo do tempo. Além disso, um menor conteúdo mineral, representado por menos ganho e mais perda de densidade óssea foi observado no grupo diabético do que no grupo controle de 2 meses. Mesmo

com ausência de diferença estatística significativa, este resultado demonstrou que não houve um aumento contínuo da densidade óssea com a idade no grupo diabético, o qual foi observado no grupo C4m e I quando comparados com o grupo C2m. Isto pode confirmar a hipótese que o osso pode ser afetado pelo DM mesmo após ter sido esperado um período de 2 meses de cicatrização, podendo ser explicado pelo metabolismo ósseo contínuo e que no Diabetes ocorre uma redução na quantidade de osteoblastos; redução na formação de matriz osteóide; e perda de substâncias minerais de Ca e P relacionados com o processo inicial da doença (3-4 semanas) atingindo uma condição osteoporótica com redução da resistência após um período longo de (12 semanas)⁹¹⁻⁹². Em adição, nossos resultados sugerem que o efeito do DM no osso já cicatrizado pode ser mais lento do que no osso em cicatrização, provavelmente este fato poderia ser explicado pela curta duração do DM neste estudo pois de acordo com Verhaeghe et al.⁹² (1990) o *turnover* ósseo no DM é lento.

A SRD é considerada um método sensível e válido para determinar sutis alterações ósseas^{16,31,36,57,94}, e o exame mostrou que o grupo diabético teve uma reduzida densidade óssea comparada com os outros grupos, interpretado como menor conteúdo mineral e esses resultados seguiram o mesmo comportamento que o resultado histométrico de porcentagem de volume ósseo em todos os grupos do nosso estudo, mesmo não sendo determinado uma correlação positiva.

Em relação ao tratamento da insulina, foi observado que os valores para a densidade óssea foram similares aos grupos controles (C2m e C4m). Este

achado sugere que o tratamento com insulina foi apto para manter a osseointegração durante o período experimental. Novamente, este resultado é dependente da metodologia empregada, no estudo piloto foi determinado uma adequada dose de insulina para obter níveis de glicose normais sem causar hipoglicemia nos ratos. Nossos resultados estão de acordo com Kwon et al.⁴⁰ (2005) porque no grupo insulínico controlado não houve redução no contato osso-implante ao longo do tempo. Este achado está de acordo com Thissen et al.⁸⁴ (1994) que mostraram que a insulina mantém os níveis de glicose e consecutivamente modula o crescimento do esqueleto. Além disso, a insulina estimula direta e indiretamente a síntese de matriz osteoblástica similar ao fator de crescimento insulínico (IGF-1) produzido pelo fígado. A insulina e o IGF- 1 têm demonstrado influenciar as proteínas de colágeno e não-colágeno⁸⁵.

Estudos prévios têm mostrado resultados controversos em relação à insulino-terapia; a explicação para estas diferenças está provavelmente no controle das doses e na frequência de administração de insulina. Nos nossos resultados, o valor mais alto de ganho ósseo de nível de cinza no grupo I está corroborando com alguns autores que reportaram à capacidade da insulino-terapia para regular e reduzir os efeitos do DM na cicatrização^{24,44,78} determinado por maior formação óssea^{24,79}.

Neste estudo, os resultados da SRD e do histométrico foram semelhantes em todos os grupos, ambos exames determinaram que os grupos C4m e I apresentaram ganho ósseo após 2 meses da indução do DM e o grupo D apresentou perda óssea. Essa relação positiva entre os achados quantitativos do

histológico e da SRD já havia sido mostrada anteriormente em uma seqüência de trabalhos realizados por Schou et al.⁷¹⁻⁷³ (2003), analisando o tratamento da periimplantite. Portanto, com essas evidências poderíamos determinar o emprego da SRD com segurança para análise do osso ao redor de implantes.

Em relação ao torque de remoção do implante esse estudo determinou que o diabetes prejudicou a retenção dos implantes, pois o grupo D apresentou a menor média do torque de remoção no período de 4 meses, esse achado está de acordo com outros autores⁴⁴ que apresentaram a necessidade de aplicar uma força menor para remover os implantes nos animais diabéticos. Diferentemente dos resultados de Margonar et al.⁴⁴ (2003), o tratamento insulínico foi capaz de corrigir os efeitos do DM, no aspecto da retenção mecânica. A resistência dos implantes ao torque de remoção pode ser correlacionada ao contato do tecido ósseo com o implante e ao grau de mineralização óssea. Estudos mostraram que os valores de torque reverso aumentam nos maiores períodos e que, quanto maior o contato osso/implante, maior a resistência ao torque reverso^{11,15,75}. Além disso, a resistência óssea em áreas de reparação é comprometida em animais diabéticos, como relatado na literatura²⁵. Porém, o DM não compromete integralmente a retenção do implante porque o osso cortical sofre menor influência da doença, os achados histológicos mostraram que a cortical óssea inferior pouco foi alterada no grupo diabético em relação aos demais grupos.

Considerando estes fatos, os resultados das análises histométricas deste estudo apresentaram uma possível relação positiva com os achados

mecânicos. Embora não tenha sido realizado no mesmo animal, neste estudo a porcentagem do volume ósseo entre as espiras e do contato entre o osso e o implante apresentaram uma relação positiva com o torque, ou seja, o grupo diabético teve menor volume ósseo, menor contato entre osso e implante e menor retenção do implante no osso, e quando se analisa o grupo insulínico todos esses parâmetros foram mais elevados em relação ao grupo D e muito semelhante ao grupo controle 4 meses.

No homem, avaliações longitudinais realizadas em pacientes diabéticos controlados que receberam implantes dentais mostraram resultados semelhantes aos encontrados em pacientes saudáveis. Contudo, a maior parte desses estudos foram realizados em pacientes que receberam implantes entre os forames mentuais, área de maior condensação óssea^{2,5-6,22,56,59}. Por outro lado, há estudos em humanos demonstrando moderadas taxas de sucesso^{23,39,50} para tratamento de implantes em pacientes diabéticos quando comparados a pacientes não-diabéticos. Fatores como tipo e duração do diabetes e os níveis de hemoglobina glicada ainda necessitam ser verificados em pacientes diabéticos em relação à severidade e duração da doença. Um outro fator que pode influenciar a taxa de sucesso é a qualidade do osso na região da instalação, o tipo do implante e da prótese como, por exemplo, prótese de carga imediata em paciente diabético. Esses fatores ainda precisam ser avaliados.

Finalmente, nossos achados mostraram que o DM, determinado pelos altos níveis de glicose, tiveram resultados menores mas não excessivamente distantes do grupo C4M. Deste modo, talvez o DM não seja uma contra-indicação

para implantes dentais, por outro lado a manutenção dele ao longo do tempo necessita de atenção porque a formação óssea parece ser negativamente influenciada pelo diabetes, este fato pode ser observado pela perda de peso contínuo dos animais e perda de substâncias envolvidas com a manutenção óssea^{47,87-88}.

Deste modo, pode ser esperado que o DM tenha um impacto negativo na qualidade do processo de reparação e há uma tendência de impacto negativo no osso já reparado ao redor de implantes. Este fato deveria ser considerado em situações clínicas para pacientes que têm indicação para colocação de implantes e pacientes que já têm implantes osseointegrados quando se tornam diabéticos, porque além das alterações ósseas também há a presença de outros fatores que comprometem a reparação desses pacientes. Entretanto, este estudo não oferece informações sobre alterações ósseas que poderiam prejudicar a manutenção do implante após a instalação da prótese nem quais mudanças ósseas poderiam acontecer em um período mais longo do que o estabelecido no nosso estudo.

7 Conclusão

De acordo com a metodologia empregada e diante das limitações deste estudo é possível concluir que:

1 – A indução experimental do *Diabetes Mellitus* parece prejudicar o tecido ósseo ao redor de implantes osseointegrados, pois houve uma tendência negativa dos resultados em relação à subtração radiográfica digital, ao torque para remoção do implante, ao contato entre osso e implante e à área óssea. Além de apresentar elevados valores de componentes ósseos bioquímicos (fosfatase alcalina plasmática e cálcio urinário) relacionados à perda óssea.

2 – A insulínoterapia evitou a ocorrência de alterações ósseas detectadas em animais diabéticos e a osseointegração não foi comprometida nesse grupo experimental.

*8 Referências**

1. Aagaard E, Donslund C, Wenzel A, Sewerin I. Performance for obtaining maximal gain from a program for digital subtraction radiography. *Scand J Dent Res.* 1991; 99: 166-72.
2. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. *Implant Dent.* 2002; 11: 83-6.
3. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990; 5: 347-59.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

[http:// www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.html)

4. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986; 1: 11-25.
5. Balshi SF, Wolfinger GJ, Balshi TJ. A retrospective analysis of 44 implants with no rotational primary stability used for fixed prosthesis anchorage. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007; 22: 467-71.
6. Balshi TJ, Wolfinger GJ. Dental implants in the diabetic patient: a retrospective study. *Implant Dent*. 1999; 8: 355-9.
7. Bergmeyer HU, Bernt E. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974. p.1205-15.
8. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3: 81-100.
9. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318: 1315-21.

10. Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. 2001; 50 (Suppl 1): 140-5.
11. Carlsson LV, Alberktsson T, Berman C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989; 4: 199-204.
12. Christgau M, Hiller KA, Schmalz G, Kolbeck C, Wenzel A. Accuracy of quantitative digital subtraction radiography for determining changes in calcium mass in mandibular bone: an in vitro study. *J Periodontal Res*. 1998; 33: 138-49.
13. Christgau M, Hiller KA, Schmalz G, Kolbeck C, Wenzel A. Quantitative digital subtraction radiography for the determination of small changes in bone thickness: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 462-72.
14. Cochran D. Implant therapy I. *Ann Periodontol*. 1996;1: 707-91.
15. Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15: 668-74.

16. Cury PR, Araujo NS, Bowie J, Sallum EA, Jeffcoat MK. Comparison between subtraction radiography and conventional radiographic interpretation during long-term evaluation of periodontal therapy in Class II furcation defects. *J Periodontol.* 2004; 75:1145-9.
17. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54: 1087-91.
18. Diabetes. Universidade Federal do Estado de São Paulo. [citado 2007 jul 15]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed119/pesq1.htm>
19. Dixit PK, Ekstrom RA. Retardation of bone fracture healing in experimental diabetes. *Indian J Med Res.* 1987; 85: 426-35.
20. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11: 318-26.
21. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19: 659-66.

22. Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent.* 2002; 11: 262-7.
23. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol 2000.* 2000; 23: 73-7.
24. Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10: 362-8.
25. Follak N, Kloting I, Wolf E, Merk H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone.* 2004; 35:144-52.
26. Gerritsen M, Lutterman JA, Jansen JA. Wound healing around bone-anchored percutaneous devices in experimental diabetes mellitus. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53:702-9.
27. Giglio MJ, Giannunzio G, Olmedo D, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes. *Implant Dent.* 2000; 9: 143-9.

28. Goodman WG, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. 1984; 33: 825-31.
29. Goodson WH 3rd, Hunt TK. Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynecol Obstet*. 1979; 149: 600-8.
30. Grandini SA, Brentegani LG, Novaes AB, Migliorini RH. Protein synthesis in wound after tooth extraction in pancreatectomized diabetic rats. *Braz Dent J*. 1990; 1: 25-30.
31. Gröndahl HG, Gröndahl K. Subtraction radiography for the diagnosis of periodontal bone lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983; 55: 208-13.
32. Haiter-Neto F, Wenzel A. Noise in subtraction images made from pairs of bitewing radiographs: a comparison between two subtraction programs. *Dentomaxillofac Radiol*. 2005; 34: 357-61.
33. Hausmann E, Christersson L, Dunford R, Wikesjo U, Phyto J, Genco RJ. Usefulness of subtraction radiography in the evaluation of periodontal therapy. *J Periodontol*. 1985; 56(Suppl 11): 4-7.

34. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio Jr E. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 188-93.

35. Hoskins B, Scott JM. Evidence for a direct action of insulin to increase renal reabsorption of calcium and for an irreversible defect in renal ability to conserve calcium due to prolonged absence of insulin. *Diabetes.* 1984; 33: 991-4.

36. Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, Kido MA, Suetsugu T, Tanaka T. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol.* 1997; 68:1169-75.

37. Jeffcoat MK. Radiographic methods for the detection of progressive alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1992; 63(Suppl 4): 367-72.

38. Jeffcoat MK, Reddy MS, Webber RL, Williams RC, Ruttimann UE. Extraoral control of geometry for digital subtraction radiography. *J Periodontal Res.* 1987; 22: 396-402.

39. Kasle MJ, Klein AI. Television radiographic evaluation of periapical osseous radiolucencies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976; 41: 789-96.
40. Klein AJ. Clinical Television Research Instrumentation. *J Am Dent Assoc.* 1967; 74: 1210-19.
41. Kopman JA, Kim DM, Rahman SS, Arandia JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Modulating the effects of diabetes on osseointegration with aminoguanidine and doxycycline. *J Periodontol.* 2005; 76: 614-20.
42. Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmoussis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 587-99.
43. Kwon PT, Rahman SS, Kim DM, Kopman JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol.* 2005; 76: 621-6.

44. Lekholm U. The use of osseointegrated implants in growing jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8: 243-4.
45. Levy JR, Murray E, Manolagas S, Olefsky JM. Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1986;119: 1786-92.
46. Lima MA, Lima LM, Rita DP, Navarro FC, Tatsukawa RS, Pereira GA et al. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito da aloxana. *Medicina*. 2001; 34: 308-14.
47. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003; 144: 346-52.
48. Margonar R. Influência do *Diabetes Mellitus* e da insulinoaterapia sobre a osseointegração: avaliação histométrica da tíbia de coelhos. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.

49. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003; 12: 333-9.

50. Mathis H, Hielscher W. *Einführung in die Zahnärztliche Roentgenologie.* Berlinische Verlagsantalt. 1962; 1: 94-104.

51. McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15: 345-54.

52. McCracken MS, Aponte-Wesson R, Chavali R, Lemons JE. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 495-500.

53. Mealey BL. Periodontal implications: medically compromised patients. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 256-321.

54. Mellado-Vallero A, Garcia JC, Ballester AH, Rueda CL. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12: E38-43.
55. Morris HF, Ochi S, Winkler S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. *Ann Periodontol*. 2000; 5: 157-65.
56. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57: 881-7.
57. Nery EB, Olson JW, Henkin JM, Kalbfleisch JH. Film-holder device for radiographic assessment of periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1985; 20: 97-105.
58. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13: 620-9.

59. Nummikoski PV, Steffensen B, Hamilton K, Dove SB. Clinical validation of a new subtraction radiography technique for periodontal bone loss detection.

J Periodontol. 2000; 71: 598-605.

60. Olson JW, Shernoff AF, Tarlow JL, Colwell JA, Scheetz JP, Bingham SF. Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2000; 15: 811-8.

61. Ortman LF, Dunford R, McHenry K, Hausmann E. Subtraction radiography and computer assisted densitometric analyses of standardized radiographs. A comparison study with 125I absorptiometry. J Periodontal Res. 1985; 20: 644-51.

62. Ottoni CE, Chopard RP. Histomorphometric evaluation of new bone formation in diabetic rats submitted to insertion of temporary implants. Braz Dent J. 2004;15: 87-92.

63. Peled M, Ardekian L, Tagger-Green N, Gutmacher Z, Machtei EE. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. Implant Dent. 2003;12:116-22.

64. Pepato MT, Folgado VB, Kettelhut IC, Brunetti IL. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34: 389-95.

65. Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol.* 1996; 271(2 Pt 1): E340-7.

66. Rees TD. Periodontal management of the patient with diabetes mellitus. *Periodontol 2000.* 2000; 23: 63-72.

67. Rezende MLR. Reações a curto prazo do tecido ósseo da tíbia de coelhos à implantação de parafusos de titânio comercialmente puro [Tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1991.

68. Rothchild H. Implant denture for a diabetic patient. *J Am Dent Assoc.* 1966; 66: 217-21.

69. Rudolph DJ, White SC. Film-holding instruments for intraoral subtraction radiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65: 767-72.

70. Rudolph DJ, White SC, Mankovich NJ. Influence of geometric distortion and exposure parameters on sensitivity of digital subtraction radiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64: 631-7.

71. Sakakura CE, Marcantonio Jr E, Wenzel A, Scaf G. Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18: 34-9.

72. Sakakura CE, Giro G, Gonçalves D, Pereira RM, Orrico SR, Marcantonio Jr E. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 134-8.

73. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti Jr FH, Alba Jr RC, Marcantonio Jr E. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol.* 2003; 74: 976-81.

74. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52:1502-10.

75. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Wenzel A. Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. I. Clinical and radiographic observations in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:391-403.

76. Schou S, Holmstrup P, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Gundersen HJ. Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. II. Stereologic and histologic observations in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:404-11.

77. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, et al. Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:535-47.

78. Schropp L, Kostopoulos L, Wenzel A. Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:189-99.

79. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7:62-71.

80. Shires R, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Avioli LV. The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J Lab Clin Med*. 1981; 97:231-40.

81. Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30:70-4.

82. Siqueira JT, Cavalher-Machado SC, Arana-Chavez VE, Sannomiya P. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dent*. 2003; 12:242-51.

83. Sociedade Brasileira de Diabetes. *Diabetes*. [citado 2007 set 20].

Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/index.php>

84. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*. 1988; 37:371-6.
85. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Törnell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001; 3:135-41.
86. Taba M, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF, Palioto DB, Pardini LC. Radiographic evaluation of dental implants with different surface treatments: an experimental study in dogs. *Implant Dent*. 2003; 12:252-8.
87. Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, Kido MA, Murai K, Suetsugu T. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol*. 1997; 68:180-5.
88. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*. 1994;15:80-101.
89. Tyndall DA, Brooks SL. Selection criteria for dental implant site imaging: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 89:630-7.

90. van der Stelt PF, Ruttimann UE, Webber RL. Determination of projections for subtraction radiography based on image similarity measurements. *Dentomaxillofac Radiol.* 1989;18:113-7.

91. Verhaeghe J, Visser WJ, Einhorn TA, Bouillon R. Osteoporosis and diabetes: lessons from the diabetic BB rat. *Horm Res.* 1990; 34:245-8.

92. Verhaeghe J, van Herck E, Visser WJ, Suiker AM, Thomasset M, Einhorn TA, et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes.* 1990; 39:477-82.

93. Versteeg CH, Sanderink GC, van der Stelt PF. Efficacy of digital intra-oral radiography in clinical dentistry. *J Dent.* 1997; 25: 215-24.

94. Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, Riccardi D. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:779-90.

95. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes.* 1981; 30:670-7.

96. Wenzel A. Effect of manual compared with reference point superimposition on image quality in digital subtraction radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 1989; 18:145-50.
97. Wenzel A, Grondahl HG. Direct digital radiography in the dental office. *Int Dent J.* 1995; 45:27-34.
98. Wenzel A, Sewerin I. Sources of noise in digital subtraction radiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71: 503-8.
99. Wenzel A, Warrer K, Karring T. Digital subtraction radiography in assessing bone changes in periodontal defects following guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 208-13.
100. Wong KK, Tzeng ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozocin administration: a comparison study. *Biochem Mol Biol Int.* 1993; 30:1035-41.
101. Wong KK, Wu HM. Effect of age and streptozotocin concentration on the induction by streptozotocin of hyperglycaemia in fasting rats. *Biochem Mol Biol Int.* 1994; 33: 131-36.

102. Ziedses des Plantes BG. Subtraction. J Am Dent Assoc. 1961; 32: 100-9.

ANEXO 1 - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humana, 1680 - CEP 14801-903 - Caixa Postal 331 Fone (0xx16) 222-4023 - Araraquara - SP
Fone: (0xx16) 201-6431 - e-mail: odontof@unesp.br Home page: <http://www.foar.unesp.br>
Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEEA

Araraquara, 20 de abril de 2004

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 018/2003

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 19/04/2004, após a avaliação final do Projeto de sua responsabilidade intitulado "Análise da textura da imagem radiográfica digital direta em implantes após o período inicial de osseointegração em coelhos com indução de diabetes *mellitus* e insulino terapia" (Proc. CEEA nº. 27/2003), considerou-o APROVADO, devendo o relatório final ser apresentado em março/2007.

Atenciosamente.


Prof. Dra. MARIA RITA BRANCINI DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEEA

À
C.D. JULIANA AP. NAJARRO DEARO DE MORAIS
DD: Pesquisador Responsável
Nesta

Anexo 2 - Resultado do estudo piloto

No Anexo 2, nove tabelas são apresentadas.

Tabela 2A – Piloto dos animais para adequação da dose de estreptozotocina na indução de *Diabetes Mellitus* nos ratos adultos.

Animal	Grupo	Droga (mg/Kg)	Via de indução	Glicemia 26/5/05	Glicemia 1/6/2005	Glicemia 8/6/2005	Glicemia 15/6/2005	Glicemia 23/6/2005	Glicemia 6/7/2005	Glicemia 18/7/2005
1	D	40	P	317,5	283	461	545	495	morreu	
2*	D	40	J	252	144	reversão	reversão	reversão	reversão	
3	D	40	P	363	384	635	552	610	569	489
4	D	40	J	337	299	549	560	545	520	559
5	D	50	J	336	396,5	455	morreu	morreu	morreu	
6	D	50	P	323	morreu	morreu	morreu	morreu	morreu	
7	D	60	P		433,5	522	550	416	511	566
8	D	60	P		413	morreu	morreu	morreu	morreu	
9	D	60	P		367	morreu	morreu	morreu	morreu	
10	D	60	J		156	reversão	reversão	reversão	reversão	
11	D	65	P		506,5	488	530	625	morreu	
12	D	65	P		354	498	548	403	morreu	
13	D	60	P		426	479	515	404	morreu	
14	D	65	P		410,5	323	508	491	morreu	
20	C	0	-			96	99	78	-	134
21	C	0	-			105	131	101	124	127
22	C	0	-			129	136	143	136	167

Animal 2 – reversão porque não foi injetado toda a droga no momento da indução.

P = via intravenosa peniana.

J= via intravenosa jugular.

Tabela 2B – Primeiro monitoramento de insulina (24 horas), com uma administração diária noturna de 3U de insulina.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos*	Hora do exame
16	t0	481		17
17	t0	453		17
Administração de insulina - 3U - 18h				
16	1h	100	-79%	19
17	1h	203	-55%	19
16	12h	459	-5%	6
17	12h	396	-13%	6
16	15h	419	-13%	8
17	15h	403	-11%	8
16	18h	460	-4%	12
17	18h	425	-6%	12
16	20h	418	-13%	14
17	20h	444	-2%	14
16	24h	339	-29%	18
17	24h	511	-13%	18

*Diferença entre os períodos: consiste no valor da glicemia em relação ao t0

Tabela 2C – Segundo monitoramento de insulina (24 horas), com duas administrações diárias de 4U de insulina (diurna e noturna).

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
15	t0	512		17
19	t0	417		17
Administração de insulina - 4U - 18h				
15	2h	399	-22%	20
19	2h	252	-40%	20
15	5h	331	-35%	23
19	5h	378	-9%	23
15	13h	572	+12%	7
19	13h	517	+24%	7
Administração de insulina - 4U - 7h				
15	15h	366	-28%	9
19	15h	259	-38%	9
15	20h	143	-72%	14
19	20h	180	-57%	14
15	24h	490	-5%	18
19	24h	394	-6%	18

Tabela 2D – Terceiro monitoramento de insulina (24 horas), com duas administrações diárias, 4,5U de insulina na dose diurna e 6U de insulina na dose noturna.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
15	t0	724		17
16	t0	536		17
<i>Administração de insulina - 6U - 18h</i>				
15	2h	416	-42%	20
16	2h	316	-41%	20
15	5h	416	-42%	23
16	5h	340	-37%	23
15	13h	496	-31%	7
16	13h	516	-4%	7
<i>Administração de insulina - 4,5U - 7h</i>				
15	15h	388	-46%	9
16	15h	344	-36%	9
15	20h	692	-5%	14
16	20h	376	-30%	14
15	24h	648	-10%	18
16	24h	595	+11%	18

Tabela 2E – Quarto monitoramento de insulina (24 horas), com duas administrações diárias, 5,5U de insulina na dose diurna e 9U de insulina na dose noturna.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
15	t0	624		17
19	t0	554		17
Administração insulina 9U - 18h				
15	2h	332	-46%	20
19	2h	192	-65%	20
15	5h	364	-42%	23
19	5h	194	-65%	23
15	13h	372	-40%	7
19	13h	264	-52%	7
Administração de insulina 5,5U - 7h				
15	14h	324	-48%	8
19	14h	220	-60%	8
15	15h	312	-50%	9
19	15h	220	-53%	9
15	16h	372	-40%	10
19	16h	290	-48%	10
15	18h	300	-52%	12
19	18h	311	-44%	12
15	24h	507	-19%	18
19	24h	492	-11%	18

Tabela 2F – Quinto monitoramento de insulina (24 horas), com duas administrações diárias, 7U (animais 15 e 19) e 5U de insulina (animais 23 e 26) na dose diurna e 11U (animais 15 e 19) e 5U de insulina (animais 23 e 26) na dose noturna.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
15	t0	716		17
19	t0	558		17
23	t0	466		17
25	t0	424		17
Administração insulina 11U para 15 e 19 5U para 23 e 26				18
15	2h	471	-34%	20
19	2h	391	-28%	20
23	2h	358	- 23%	20
25	2h	79	- 81%	20
15	5h	471	-34%	23
19	5h	404	-28%	23
23	5h	352	- 25%	23
25	5h	122	- 71%	23
15	13h	515	-28%	7
19	13h	454	-18%	7
23	13h	100	- 78%	7
26	13h	353	- 17%	7
Administração insulina 7U para 15 e 19 5U para 23 e 25				7
15	14h	396	-45%	8
19	14h	248	-56%	8
23	14h	145	- 69%	8
26	14h	153	- 64%	8
15	15h	398	-44%	9
19	15h	269	-52%	9
23	15h	110	- 76%	9
26	15h	80	- 81%	9
15	16h	450	-37%	10
19	16h	277	-50%	10
23	16h	118	- 75%	10
26	16h	59	- 86%	10
15	18h	398	-44%	12
19	18h	319	-43%	12
23	18h	109	- 76%	12
26	18h	50	- 88%	12
15	24h	346	-51%	18
19	24h	534	-4%	18
23	24h	448	-4%	18
26	24h	293	-30%	18

Tabela 2G – Extensão do quinto monitoramento de insulina para 5 dias, com duas administrações diárias, 7U (animais 15 e 19) e 5U de insulina (animais 23, 25 e 26) na dose diurna e 11U (animais 15 e 19) e 5U de insulina (animais 23, 25 e 26) na dose noturna.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
15	2h	446	-38%	20
19	2h	324	-41%	20
23	2h	167	-64%	20
26	2h	90	-79%	20
Segundo dia de monitoramento				
15	12h	84	-88%	7
19	12h	236	-58%	7
23	12h	231	-50%	7
25	12h	378	-	7
26	12h	328	-23%	7
Administração insulina - 7h				
15	2h	153	-79%	9
19	2h	127	-77%	9
23	2h	70	-85%	9
25	2h	163	-57%	9
26	2h	51	-88%	9
Quinto dia de monitoramento				
15	12h	107	-85%	7
19	12h	45	-92%	7
23	12h	438	-6%	7
25	12h	237	-37%	7
26	12h	123	-71%	7
Administração de insulina - 7h				
15	2h	35	-95%	9
19	2h	51	-91%	9
23	2h	43	-90%	9
25	2h	62	-84%	9
26	2h	50	-88%	9

Tabela 2H – Extensão do quinto monitoramento de insulina para 11 dias, com duas administrações diárias, 3,5U de insulina na dose diurna e 5U de insulina na dose noturna.

Animal	Tempo pós insulina	Glicemia	Diferença entre os períodos	Hora do exame
<i>Nono dia de monitoramento</i>				
23	12h	314	-33%	7
25	12h	381	-1%	7
26	12h	382	-10%	7
<i>Administração de insulina</i>				
23	2h	45	-90%	9
25	2h	37	-90%	9
26	2h	14	-97%	9
<i>Décimo primeiro dia de monitoramento</i>				
23	12h	481	+3%	7
25	12h	461	+22%	7
26	12h	307	+28%	7
<i>Administração de insulina</i>				
23	2h	36	-92%	9
25	2h	24	-94%	9
26	2h	33	-93%	9

Tabela 2I – Determinação bioquímica da glicemia, cálcio no soro e na urina, fósforo no soro e na urina e fosfatase alcalina.

Animal	Grupo	Peso	Volum e urina	Glicemia	Cálcio soro	Cálcio urina	Fósforo soro	Fósforo urina	Fosfatas e alcalina
1	D	274	190	495	9,63	14,06	mat insuf	15,2	222
3	D	318	180	610	8,11	16,2	4,95	29,2	233
4	D	313,5	190	545	8,93	13,3	6,2	11,5	211
7	D	310	110	416	7,85	10,56	5,2	0,99	234
11	D	282,5	110	625	mat insuf	10,97	mat insuf	47	231
12	D	225,5	180	403	8,87	14,04	11,35	18,54	234
13	D	236	170	404	10,2	19,72	6,7	29,8	232
14	D	248	140	491	8,8	10,92	6,4	32	236
Média		275*	159*	498,6*	8,91	13,72*	6,8	23,03	229,12*
Desvio Padrão		36	34	89,1	0,81	3,12	2,33	14,34	8,46
20	C	493	20	78	9,03	1,1	5,6	18,7	28
21	C	425	50	101	8,08				44
22	C	532	20	143	7,72	2,02	5,3	19,2	43
Média		483	30	107,3	8,28	1,56[#]	5,45	18,95	38,33
Desvio Padrão		54,17	17,3	32,9	0,68	0,65	0,21	0,35	8,96

* P<0.05 – diferença estatística significativa entre os grupos

[#] P<0.05 – diferença estatística significativa entre os grupos

D= grupo diabético; C= grupo controle

Anexo 3 - Tabelas dos dados do estudo

Tabela 3A – Valores de glicemia dos animais do histométrico

Glicemia											
Exames					Exames						
Grupo	1	2	3	4	5	Grupo	1	2	3	4	5
Controle 2					Diabético						
meses											
42	128	96	181			2	146	87	589	360	544
44	138	117	198			4	161	86	673	404	524
45	190	95	115			6	150	106	597	464	536
63	146	144	163			7	153	96	497	450	376
64	117	99	145			28	81	112	688	364	520
69	120	90	177			29	125	119	638	448	600
66	139	121	149			30	133	98	628	320	512
67	114	112	150			46	177	81	543	344	532
70	141	99	156			59	127	109	543	350	528
média	137	108.1111	159.3333			35	106	94	667	470	600
dp	22.9401	17.1788	24.1506			média	135.9	98.8	606.3	477.4	527.2
ep	7.6467	5.7263	8.0502			dp	27.9422	12.4258	63.7966	56.4049	61.5879

						ep	8.8361	3.9294	20.1743	17.8368	19.4758
Controle 4						Insulina					
meses											
54	169	119	115	123	99	60	132	107	410	39	39
49	150	100	127	113	90	31	144	118	606	57	42
13	215	127	188	119	106	57	121	76	638	33	32
38	144	101	160	113	108	38	120	92	589	55	48
21	130	79	150	126	51	1	153	86	743	59	51
24	125	142	189	125	118	15	153	117	664	40	40
26	131	105	158	162	100	33	161	90	645	54	43
71	122	112	171	122	109	50	131	125	658	25	26
12	179	97	157	142	123	17	189	80	710	65	46
23	138	109	169	108	103	61	153	95	463	55	50
média	150.3	109.1	158.4	125.3	100.7	média	145.7	98.6	612.6	48.2	41.7
dp	29.3941	17.4066	23.6371	15.9308	19.8329	dp	20.9393	17.0893	103.7713	13.0111	7.931
ep	9.2952	5.5044	7.4747	5.0377	6.2717	ep	6.6216	5.4041	32.8154	4.1145	2.508

Tabela 3B - Dados da análise da subtração radiográfica

Níveis de cinza de ganho				
	Cont 2m	Cont 4m	Diab	Ins
	109.79	132.54	129.04	143.27
	145.51	113.14	128.05	142.91
	118.12	102.31	123.96	137.75
	145.06	146.47	126.35	141.17
	124.67	129.22	105.99	113.83
	117.39	159.48	129.69	136.4
	126.53	139.16	119.44	132.17
	143.61	142.33	122.14	128.39
	115.19	122.11	114.23	131.8
	132.36	142.78	136.46	129.9
média	127.823	132.954	123.535	133.759
dp	13.24617	16.90707	8.672177	8.814581

Níveis de cinza de perda				
	Cont 2m	Cont 4m	Diab	Ins
	47.46809	0	52.41481	0
	119.2579	99.67422	115.5412	130.7297
	104.4364	0	0	125.8935
	127.3871	127.4555	51	0
	109.556	54.71429	88.96721	0
	52.5	0	117.5943	61.77419
	118.806	120.763	101.7558	121.7832
	131.4339	131.4439	112.9094	106.5884
	44.32468	0	100.1111	55.90385
	0	51.7	118.9725	54.625
média	85.517	58.57509	85.92663	65.72978
dp	45.45045	57.15203	39.28142	53.59602

Tabela 3D - Dados da análise histométrica da área óssea

	C2m	C4m	D	I
	46.35	65.13	62.54	64.6
	33.53	55.12	59.46	74.26
	62.41	71.65	62.82	63.61
	67.53	68.97	65.6	65.64
	56.21	63.81	50.71	68.28
	50.33	68.93	68.49	67.74
	57.82	54.56	53.57	63.41
	57.96	57.79	69.66	61.66
	53.23	64.2	51.43	73.2
	53.93	63.54	63.81	67.3
média	53.93	63.37	60.809	66.97
dp	9.312526	5.884594	6.8355	4.135483
Teste de normalidade Shapiro-Wilk				
Resultados	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -
Tamanho da amostra =	10	10	10	10
Média =	53.93	63.37	60.809	66.97
Desvio padrão =	9.3125	5.8846	6.8355	4.1355
W =	0.9398	0.9231	0.9144	0.9206
p =	0.5218	0.4135	0.3631	0.3989
ANOVA				
FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	
Tratamentos	3	91.0 e+01	303.294	
Erro	36	16.7 e+02	46.294	
F =	6.5514			
(p) =	0.0015			
Média (Coluna 1) =	53.93			
Média (Coluna 2) =	63.37			
Média (Coluna 3) =	60.809			
Média (Coluna 4) =	66.97			
Tukey:	Diferença	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	9.44	4.3874	< 0.05	
Médias (1 a 3) =	6.879	3.1971	ns	
Médias (1 a 4) =	13.04	6.0606	< 0.01	
Médias (2 a 3) =	2.561	1.1903	ns	
Médias (2 a 4) =	3.6	1.6732	ns	
Médias (3 a 4) =	6.161	2.8634	ns	

Tabela 3E - Dados do torque de remoção do implante

	Controle2m	Controle4m	Diabético	Insulínico
	14	14	14.5	21
	17.5	14.5	15.5	20.5
	13	16.5	15	17.5
	9.5	15	13	15.5
	13.5	16.5	14.5	20
	16.5	15.5	10.5	18
	14.5	18	15	15
	13	29.5	7	14
	13.5	20.5	12	14.5
	10.5	10.5	12	12
	9	16	13	20
média	13.13636	16.95455	12.90909	17.09091
dp	2.656039	4.844866	2.508168	3.064459

Teste de normalidade perna direita – Shapiro Wilk – não houve normalidade

Resultados - 1 - - 3 - - 5 - - 7 -

Tamanho da amostra = 11 9 11 11

Média = 13.1364 16.9444 12.9091 17.0909

Desvio padrão = 2.6560 5.3935 2.5082 3.0645

W = 0.9446 0.8222 0.8686 0.9263

p = 0.5553 0.0447 0.0858 0.4146

Teste estatístico de Kruskal Wallis

Resultados

H = 12.6449

Graus de liberdade = 3

(p) Kruskal-Wallis = 0.0055

R 1 = 166.5000

R 3 = 243.0000

R 5 = 167.0000

R 7 = 326.5000

R 1 (posto médio) = 15.1364

R 3 (posto médio) = 27.0000

R 5 (posto médio) = 15.1818

R 7 (posto médio) = 29.6818

Comparações (método de Dunn) Dif. Postos z calculado z crítico

Postos médios C2m e C4m 11.8636 2.1516 2.635 ns

Postos médios C2m e C4m 0.0455 0.0087 2.635 ns

Postos médios C2m e I 14.5455 2.7806 2.635 < 0.05

Postos médios C4m e D 11.8182 2.1433 2.635 ns

Postos médios C4m e I 2.6818 0.4864 2.635 ns

Postos médios D e I 14.5000 2.7719 2.635 < 0.05