



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



**LUCAS AMARAL FONTANARI**

INFLUÊNCIA DE UMA SUPERFÍCIE MODIFICADA POR  
FLUORETOS NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTAIS EM RATOS DIABÉTICOS

ARARAQUARA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

**LUCAS AMARAL FONTANARI**

INFLUÊNCIA DE UMA SUPERFÍCIE MODIFICADA POR  
FLUORETOS NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTAIS EM RATOS DIABÉTICOS

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ODONTOLOGIA – ÁREA DE IMPLANTODONTIA, DA FACULDADE  
DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA UNIVERSIDADE  
ESTADUAL PAULISTA, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM ODONTOLOGIA.

**Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio**

**Co-orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Júnior**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvana Regina Perez Orrico**

ARARAQUARA

2013

**LUCAS AMARAL FONTANARI**

**INFLUÊNCIA DE UMA SUPERFÍCIE MODIFICADA POR  
FLUORETOS NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTAIS EM RATOS DIABÉTICOS**

**COMISSÃO JULGADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

2º Examinador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

3º Examinador: Prof. Dra. Ana Emília Faria Pontes

4º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

5º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Araraquara, 27 de Setembro de 2013.

## ***DADOS CURRICULARES***

LUCAS AMARAL FONTANARI

NASCIMENTO: 21.12.1984- Maringá-PR

FILIAÇÃO: Luiz Carlos Fontanari

Lucília Amaral Fontanari

2002 - 2006: Curso de Graduação

Universidade Estadual de Londrina-UEL

2007 - 2008 Curso de Especialização em Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2008 - 2010 Curso de Pós-Graduação em Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2009 - 2011 Curso de Especialização em Implantodontia

FAEPO - Araraquara

2010 - 2013 Curso de Pós-Graduação em Implantodontia

Nível: Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

***DEDICO ESTE TRABALHO...***

***A minha mãe, Lucília***

Obrigado por sempre acreditar, esta conquista é sua.

***Ao meu pai, Luiz Carlos***

Meu espelho profissional e pessoal, amigo acima de tudo.

***A minha irmã, Daniela***

Obrigado por todos os ensinamentos e conselhos. Desculpe-me pela ausência no seu dia-a-dia, a qual a distância sempre foi responsável.

***A minha esposa, Juliana***

Minha amiga, minha companheira, minha mulher. Sem você nada disso faria sentido.

***Vocês são o meu maior título, a minha maior  
especialidade, a minha maior conquista,  
o meu maior presente.***

**Amo vocês**

## ***AGRADECIMENTOS***

**A toda minha família Amaral, Fontanari e Manne.**

**Aos verdadeiros amigos,** Guilherme, João, Marcus, Túlio, Mário, Rubens, Wagner, Humberto e Andrés. Cada momento compartilhado com vocês foi especial e inesquecível. Obrigado meus grandes amigos.

**A professora Silvana R. Perez Orrico,** pela ajuda, orientação, conselhos e paciência. Meus sinceros agradecimentos.

**Ao professor Elcio Marcantonio Junior,** por toda colaboração durante a realização deste trabalho.

**Ao professor Carlos Rossa Junior,** fundamental na elaboração deste projeto.

**Ao meu orientador José Eduardo Cezar Sampaio**, minhas sinceras desculpas por momentos falhos e meus eternos agradecimentos por toda orientação, seja ela profissional e também pessoal. A minha admiração e meu agradecimento a um exemplo de pessoa e profissional que me acolheu em sua casa e em sua família.

**A todos os colegas do curso de pós-graduação.**

**A aluna de pós-graduação Vânia Ortega, a Professora Regina e a todos os funcionários do laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP**, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

**A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, em especial à Regina Lúcia, D.Maria, Cláudia e Maria José, pelo carinho e atenção a mim dispensados.

**Aos funcionários de Pós-graduação em especial à Mara**, pela atenção e paciência.

**A CAPES e a FAPESP**, pelo apoio financeiro por meio da Bolsa de Estudos e do auxílio para realização deste trabalho.

*A Deus, pela minha saúde e pelas oportunidades a mim oferecidas.*



## **RESUMO**

---

---

Fontanari LA. Influência de uma superfície modificada por fluoretos na osseointegração de implantes dentais em ratos diabéticos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## ***RESUMO***

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que algumas condições sistêmicas como o Diabetes mellitus podem alterar o processo de reparo ósseo. Na cavidade bucal, o diabetes pode estar associado à deficiência na osseointegração e pior prognóstico no tratamento com implantes dentais. Assim, modificações na superfície dos implantes que favoreçam a reparação do tecido ósseo poderiam ajudar a compensar as influências deletérias relacionadas ao diabetes. Este estudo tem por objetivo avaliar, em animais diabéticos, a influência de uma superfície modificada por fluoretos na osseointegração. A amostra consistiu de 180 ratos (90 para teste biomecânico e 90 para histometria) aleatoriamente divididos em três grupos de 60 animais: grupo controle (Grupo C), composto por ratos saudáveis; grupo Diabetes descompensado, composto por animais em que foi realizada indução de Diabetes mellitus (Grupo D); e grupo Diabetes Controlado (Grupo DC) em que o diabetes induzido experimentalmente foi controlado com administração de insulina. O diabetes foi induzido em ratos por injeção de estreptozotocina. Após 4 semanas da indução, cada animal recebeu 2 implantes nas metáfises tibiais proximais, sendo 1 de superfície maquinada (M) e o outro de superfície tratada com fluoretos (F). Os animais foram sacrificados 2, 4 e 6 semanas após a instalação dos implantes. A resistência biomecânica foi avaliada ex-vivo por meio do torque de remoção, e a qualidade do tecido ósseo formado ao redor dos implantes por meio de cortes histológicos não

descalcificados, aonde mediu-se a superfície de contato osso/implante (BIC) e a fração de área de tecido ósseo entre as roscas do implante (BAFO). Os dados numéricos (peso, glicemia, torque de remoção, BIC e BAFO) foram avaliados estatisticamente por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e pelos testes paramétricos ANOVA complementado pelo teste de Tukey aplicados com 5% ( $p < 0.05$ ) de nível de significância. Em relação à análise biomecânica, para os implantes maquinados o grupo D obteve menores valores de torque ( $p < 0,05$ ) que o grupo C, mas similares ao grupo DC em 4 e 6 semanas. Para os implantes F, o grupo D apresentou menores valores ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos outros 2 grupos. Quando as superfícies F e M foram comparadas no mesmo período de avaliação, F sempre apresentou valores maiores que M ( $p < 0.0001$ ), para todos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando o BIC foi analisado, independente da superfície utilizada. Quando o BAFO foi analisado, observou-se diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em 4 semanas para os grupos C e DC em comparação ao grupo D, apenas para superfície M. Na análise intra-grupos, a superfície F apresentou tendência a maiores valores de BAFO para os 3 períodos de avaliação no grupo D, em comparação a superfície M. Pode-se concluir que o DM afetou negativamente a osseointegração, porém a insulina foi capaz de reverter esse efeito. A superfície F favoreceu a retenção mecânica dos implantes e foi capaz de reverter levemente o efeito negativo do diabetes sobre o percentual de preenchimento ósseo entre as roscas.

Palavras-chaves: Implantes dentários; Fluoretos; Diabetes Mellitus.

## **ABSTRACT**

---

---

Fontanari LA. Influence of a surface modified by fluoride in the osseointegration of dental implants in diabetic rats [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## **ABSTRACT**

Pre-clinical and clinical studies have been showed that some systemic diseases like the diabetes mellitus may alter the bone repair process. At the oral cavity, the diabetes may be associated with poor osseointegration of dental implants and worsening of the prognosis of dental implants treatment. Thus, modifications on the dental implants surfaces that enhance the bone repair could help to offset the deleterious influences related to diabetes. The aim of this study was to evaluate, in diabetic rats, the influence of different implants surfaces on the osseointegration. A sample of 180 rats (90 for the biomechanical analysis and 90 for the histometric analysis) was randomly allocated in 3 groups of 60 rats each: Control Group (C): Healthy animals; Non-controlled diabetes Group (D): Animals with uncontrolled diabetes; Controlled Diabetes Group (DC): Animals with controlled diabetes. The diabetes was induced by injection of streptozotocin and it was controlled by injectios of insulin. After 4 weeks of the diabetes induction, all the animals received 1 implant in each tibia, one with a machined surface (M) and the other one with a fluoride surface modification. The animals were euthanized 2, 4 and 6 weeks after the implants placement. The biomechanical analysis was performed *ex vivo* by means of removal torque resistance, and the quality of the bone tissue formed around the implants was assessed by histometric analysis of bone / implant contact (BIC) and bone area between the threads of the implant (BAFO). The numerical data (Weight, Glicemic index, removal torque, BIC, and BAFO) were evaluated by the normality

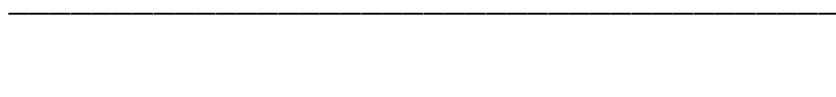
test of Shapiro-Wilk and the one-way Anova complemented by the Tukey's test. All the statistical tests were applied with a significance level of 5%. Regarding the biomechanical analysis, for the machined surface implants, the group D showed lower removal torque values ( $p < 0.05$ ) than the group C, but similar to the group DC at 4 and 6 weeks. For fluoride modified implants, the group D had the lowest value of removal torque ( $p < 0.05$ ). The fluoride modified implants had the higher values than the machined implants in all the periods of evaluation ( $p < 0.001$ ). No differences in the BIC analysis were detected between the groups. The BAFO analysis showed that the groups C e DC presented a higher values than the group D ( $p < 0.05$ ), only when the machined implants were used. The fluoride modified surfaces showed a tendency of higher values of BAFO than machined implants in the group D. It can be concluded that the Diabetes Mellitus had an adversely effect on the osseointegration, but the insulin was able to partially counterattack it. The fluoride modified implants improves the mechanical retention of implants and it was able to slightly reverse the negative effect of diabetes mellitus on the percentage of bone fill between the threads.

**Key-Words:** Dental implants, diabetes mellitus, fluoride.

## *SUMÁRIO*

1	Introdução.....	17
2	Proposição.....	23
3	Capítulo1.....	25
4	Capítulo 2.....	45
5	Capítulo 3.....	66
6	Discussão.....	90
7	Conclusão.....	98
	Referências.....	100
	Apêndice - Material e Métodos.....	108
	Anexo - Certificado Comitê de Ética.....	117

## **1 INTRODUÇÃO**





## ***1 INTRODUÇÃO***

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças caracterizadas pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina pelo pâncreas, em sua ação ou em ambos <sup>2</sup>. O DM é um dos mais importantes problemas mundiais de saúde na atualidade, tanto em termos de número de pessoas afetadas, incapacitação, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações. A prevalência do DM na população adulta mundial é de cerca de 6,4%, e há uma tendência ao aumento desta nos países desenvolvidos com uma previsão de 7,7% para 2030, devido à longevidade progressiva das populações e às modificações socioculturais decorrentes do desenvolvimento urbano <sup>61</sup>.

A glicemia elevada que caracteriza os pacientes portadores de diabetes interage com diversas proteínas plasmáticas (por ex., hemoglobina) num processo de glicação, formando os chamados produtos finais da glicação avançada (*Advanced Glycation End-products*, AGEs) <sup>40</sup>. Estes AGEs interagem com receptores multi-ligantes presentes em diversos tipos celulares, os receptores para produtos finais da glicação avançada (Receptor for Advanced Glycation End-products, RAGE), induzindo alterações no metabolismo celular que, além de influenciar a resposta imune e vascularização, levam a modificações no *turnover* do colágeno e de proteoglicanas da matriz extracelular, afetando tanto o tecido conjuntivo não-mineralizado quanto mineralizado <sup>64, 66, 67</sup>. As complicações sistêmicas relacionadas à descompensação metabólica apresentam-se como doenças macrovasculares, microvasculares, neuropáticas e alterações da resposta imune/inflamatória. Todas estas manifestações acabam comprometendo o processo de cicatrização de pacientes com diabetes, assim como a formação e a remodelação óssea <sup>28, 32</sup>.

As alterações relacionadas à formação óssea podem ser descritas como <sup>28, 55</sup>:

- Inibição da formação da matriz colágena
- Alterações na arquitetura óssea
- Aumento no período de mineralização intramembranosa e endocondral do tecido osteóide
- Redução do *turnover* ósseo
- Diminuição do número de osteoblastos e osteoclastos
- Alteração do metabolismo ósseo
- Redução na produção de osteocalcina

### ***Diabetes afeta negativamente a osseointegração***

O implante dental é uma opção de tratamento na reabilitação funcional e estética de pacientes parcial ou totalmente edêntulos <sup>4, 11</sup>, e toda a sua aplicabilidade é fundamentada pelo princípio da osseointegração. Estudos demonstram que adultos com DM apresentam risco 2,8 a 3,4 vezes maior de desenvolver periodontite do que indivíduos sem diabetes <sup>8, 63</sup>. Considerando a prevalência desta patologia <sup>43</sup> na população mundial, a severidade da doença periodontal <sup>13</sup> e a perda dental, tratamentos reabilitadores são realizados com frequência nesses pacientes, e a implantodontia oferece uma importante opção de tratamento <sup>1</sup>.

A osseointegração é definida como o contato direto do tecido ósseo vivo com o metal de um implante em função <sup>11</sup>, observado em microscopia óptica. Segundo Albrektson et al. <sup>5</sup> (1981) alguns fatores relacionados ao implante podem ser controlados para se alcançar a osseointegração, como biocompatibilidade do material, técnica cirúrgica utilizada para instalação, desenho, condições das cargas aplicadas

após sua instalação e qualidade da superfície utilizada. No entanto, os fatores relacionados à capacidade de reparo não estão sob o controle do clínico e podem variar segundo características genéticas e fenotípicas de cada indivíduo, incluindo a qualidade do tecido ósseo e influências de doenças e condições sistêmicas, como o diabetes.

A inserção de implantes é um procedimento que provoca um trauma cirúrgico direto no tecido ósseo, afetando no periósteo e porção medular diversos tipos celulares incluindo fibroblastos, osteoblastos, células da resposta imune e células endoteliais. Os mediadores biológicos produzidos pelas células da região conduzirão o processo reparativo, e condições sistêmicas, como o diabetes, que modulem a função destas células podem afetar a extensão, velocidade e natureza do reparo. A osseointegração dos implantes requer o recrutamento de células precursoras de osteoblastos, sua ancoragem, adesão, espreadimento, proliferação, e diferenciação em osteoblastos que produzirão matriz extracelular calcificada sobre a superfície de titânio<sup>54, 60</sup>, todos estes eventos celulares são altamente sensíveis ao microambiente e a mediadores biológicos presentes.

Estudos têm demonstrado que algumas condições sistêmicas como doenças reumatológicas e hormonais (Diabetes mellitus), podem alterar o processo de reparo ósseo ao redor dos implantes dentais, levando a uma deficiência na osseointegração<sup>21, 22, 42, 56</sup>. Assim, a presença do DM tem sido considerada como uma relativa contraindicação à instalação de implantes<sup>23, 28</sup>, havendo ainda controvérsias nos estudos que avaliaram o efeito do DM e/ou do controle metabólico no sucesso da osseointegração.

Estudos em animais mostram que o DM pode interferir negativamente no reparo ósseo ao redor de implantes, devido à ocorrência de formação óssea reduzida e

lenta, menor contato osso/implante e osso neoformado imaturo e menos organizado<sup>39</sup>,<sup>42</sup>. Por outro lado, Nevins et al.<sup>48</sup> (1998) não verificaram falha nos implantes e/ou infecção durante o experimento, constatando o estabelecimento da osseointegração mesmo na presença do DM. Os resultados de McCracken et al.<sup>43</sup> em 2000 e McCracken et al.<sup>44</sup> em 2006 revelaram maior volume ósseo ao redor de implantes em ratos com diabetes descompensado quando comparados aos ratos com diabetes controlado e aos animais sem diabetes, porém, verificaram que o osso formado era menos organizado. Entretanto, em nenhum destes estudos o tipo de superfície do implante foi alvo de discussão dos autores, sendo que estudos em animais com DM que utilizaram implantes de superfície maquinada mostraram menor retenção mecânica e reparação óssea deficiente<sup>42, 62</sup>.

Por outro lado, alguns estudos clínicos relatam taxas de sucesso moderadas a excelentes para implantes inseridos em pacientes portadores de diabetes compensado<sup>3, 7, 27, 28, 50</sup> ou não<sup>20</sup>. Deve-se ressaltar que alguns desses estudos foram realizados em pacientes que receberam implantes entre os forames mentonianos, considerada uma área de melhor qualidade óssea<sup>7, 50</sup>, enquanto outros avaliaram os implantes apenas no período inicial de reparação, previamente à instalação da prótese<sup>20</sup>.

### ***Implantes dentais com superfícies tratadas com fluoretos como alternativa para favorecimento do reparo ósseo***

Nos últimos anos a busca por um aumento na integração osso-implante e formação óssea mais rápida tem voltado a atenção para modificações nas superfícies dos implantes. A diminuição do tempo de osseointegração poderia favorecer o adiantamento da fase protética e até, a utilização de técnicas mais modernas como a carga imediata. Alterações na superfície favorecem a reparação acelerando a

formação óssea <sup>16</sup>, aumentando o contato osso-implante <sup>68</sup> e influenciando eventos celulares, como adesão, migração, diferenciação e expressão gênica de células em contato com o implante e nas suas proximidades <sup>19, 34, 59</sup>.

Portanto, modificações na superfície do titânio podem favorecer a osseointegração, e a adição de íons fluoreto é um dos métodos usados para tal. Esta técnica é útil para a produção de camadas superficiais mais reativas, as quais são integradas ao substrato. A adição de fluoretos à superfície aumenta a biocompatibilidade <sup>33</sup>, favorece a formação óssea durante os períodos iniciais de cicatrização <sup>14</sup>, estimula a proliferação de osteoblastos <sup>10, 69</sup> e aumenta a afinidade da camada de dióxido de titânio aos íons cálcio e fosfato <sup>35</sup>, que conseqüentemente favorece o processo de deposição e formação óssea <sup>25, 30, 70</sup>.

Estas características da superfície modificada com fluoretos, além de otimizar o procedimento, poderiam permitir a colocação dos implantes em função mais precocemente e ampliar a gama de aplicações possíveis com osso alveolar de densidade inferior ou em situações de reparo deficiente, como no caso do DM.

## **2 PROPOSIÇÃO**

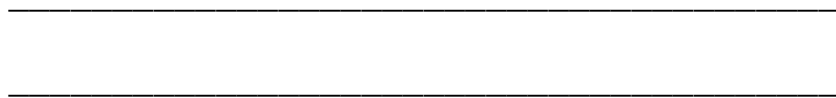
---

---

## ***2 PROPOSIÇÃO***

Avaliar por meio de teste biomecânico (torque de remoção) e histométrico, a influência de uma superfície modificada por fluoretos na osseointegração de implantes dentais em ratos diabéticos.

### **3 CAPÍTULO 1**



\*Artigo será submetido à publicação no periódico Minerva Stomatológica



### **3 CAPÍTULO 1**

#### **Influência de diferentes superfícies de implante sobre a osseointegração no Diabetes mellitus: Revisão sistemática da literatura**

**Lucas Amaral Fontanari (Fontanari LA)** Doutorando em Implantodontia<sup>1</sup>

**Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira (Oliveira GJPL)** Doutorando em  
Periodontia<sup>1</sup>

**Túlio Luis Durigan Basso (Basso TLD)** Doutorando em Implantodontia<sup>1</sup>

**Elcio Marcantonio Junior (Marcantonio Jr E)** Professor titular em Periodontia<sup>1</sup>

**Silvana Regina Perez Orrico (Orrico SRP)** Professor Adjunto em Periodontia<sup>1</sup>

**José Eduardo Cezar Sampaio (Sampaio JEC)** Professor adjunto em Periodontia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Foar-UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Autor para Correspondência:**

José Eduardo Cezar Sampaio

Rua Humaitá, 1680. CEP 14801-130, Araraquara, SP. Brasil

Telefone: (16) 33141366 / Fax: (16) 81329545

e-mail: [jsampaio@foar.unesp.br](mailto:jsampaio@foar.unesp.br)

## **Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de revisão sistemática da literatura, a influência de diferentes superfícies de implante sobre a osseointegração no diabetes. Foi executada uma busca na base de dados Pubmed, utilizando a combinação das seguintes palavras-chave “Implants surface” OR “Dental Implants” AND “Diabetes” OR “Hiperglycemia”. Foram selecionados artigos publicados em inglês, no período de Janeiro de 1960 a Maio de 2013. Todos os modelos experimentais foram considerados nessa busca, porém relatos de casos clínicos e estudos *in vitro* foram excluídos da revisão. Foram encontrados 175 artigos e, após a leitura dos títulos e abstracts, foram selecionados 37 artigos para leitura na íntegra. Finalmente, 3 artigos foram selecionados para serem descritos e discutidos nessa revisão. Devido a grande heterogeneidade metodológica dos estudos selecionados não foi possível a realização de uma metanálise dos dados. Foi concluído que, apesar da plausibilidade biológica da modificação da superfície de implantes com o objetivo de melhorar a osseointegração em indivíduos com DM, ainda existem poucas evidências quanto aos benefícios dessas modificações.

**Palavras chaves:** Diabetes mellitus, Implantes dentários, Osseointegração.

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate, through a systematic review, the effect of different implant surfaces modification on the osseointegration in diabetic subjects. A search was performed in Pubmed database, using a combination of the following keywords "Implants surface" OR "Dental Implants" AND "Diabetes" OR "Hiperglycemia". Papers published in english between January 1960 until May 2013 were selected. All experimental models have been considered in this search, but case reports and *in vitro* studies were excluded of this review. The initial search identified 175 articles. After reading the titles and abstracts 37 articles were selected for full reading. Finally, 3 papers were selected after the elavuation of the entire paper and it were discussed in this review. Due to methodological heterogeneity of the selected studies it was not possible to perform a meta-analysis of the data. It can be concluded that although the benefits of surface modifications present in individuals with diabetes have a biological plausibility, there is a lack of evidence for the benefits of these modifications.

**Key Words:** Dental implants, Diabetes mellitus, Osseointegration

## **Introdução**

A implantodontia é uma opção de tratamento na reabilitação funcional e estética de pacientes parcial ou totalmente edêntulos (1) e toda a sua aplicabilidade é fundamentada pelo princípio da osseointegração (2, 3). Segundo Albrektson et al. (1981) (4) alguns fatores relacionados ao implante são determinantes para se alcançar a osseointegração, como biocompatibilidade do material, técnica cirúrgica, desenho do implante, condições das cargas aplicadas após sua instalação, qualidade da superfície utilizada e sítio de instalação. Dentre esses fatores, as condições do sítio cirúrgico não estão sob o controle do clínico, pois variam de acordo com as condições sistêmicas do paciente (5).

A inserção de implantes é um procedimento que provoca um trauma cirúrgico direto no tecido ósseo afetando diversos tipos celulares, presentes no periósteo e na porção medular, tais como fibroblastos, osteoblastos, células da resposta imune e células endoteliais, sendo que os mediadores biológicos produzidos por estas células conduzirão o processo de osseointegração (6). Esse fenômeno requer o recrutamento de células precursoras de osteoblastos, assim como sua ancoragem, adesão, espraiamento, proliferação, e diferenciação em osteoblastos, os quais produzirão matriz extracelular calcificada sobre a superfície de titânio (6, 7). Entretanto todos estes eventos celulares são altamente sensíveis ao microambiente e ao tipo e concentração dos mediadores biológicos presentes.

Condições sistêmicas como o Diabetes mellitus podem alterar o processo de reparo ósseo ao redor dos implantes dentais, levando a uma deficiência na osseointegração (8). Estudos (9) mostram alguns mecanismos de influência do diabetes sobre o tecido ósseo, tais como: inibição da formação da matriz de colágeno;

alterações na arquitetura óssea; aumento no período de mineralização intramembranosa e endocondral; redução do *turnover* ósseo; diminuição do número de osteoblastos e osteoclastos; alteração do metabolismo ósseo e redução na produção de osteocalcina.

Assim, a presença do DM tem sido considerada por alguns autores como uma relativa contraindicação à instalação de implantes (5, 10, 11), havendo entretanto controvérsias nos estudos quanto ao efeito do DM e/ou do controle metabólico no sucesso da osseointegração. Dessa forma, a utilização de modificações na superfície dos implantes, que tem demonstrado acelerar o processo de cicatrização em animais saudáveis (12, 13), tem sido uma proposta para melhorar a osseointegração em indivíduos com desordens metabólicas que prejudicam o reparo ósseo (14). O objetivo dessa revisão sistemática da literatura é discutir os estudos clínicos e pré-clínicos que avaliaram a aplicação de diferentes superfícies de implantes em diabéticos.

### **Material e métodos**

Para essa revisão foi realizada uma busca de estudos clínicos e pré-clínicos que avaliaram a aplicação de implantes com diferentes superfícies. Foi executada uma busca na base de dados Pubmed, utilizando a combinação das seguintes palavras-chave “Implants surface” OR “Dental Implants” AND “Diabetes” OR “Hiperglycemia”. Foram selecionados artigos publicados em inglês, no período de Janeiro de 1960 a Maio de 2013. Todos os modelos experimentais foram considerados nessa busca, porém relatos de casos clínicos e estudos *in vitro* foram excluídos da revisão. A seleção dos artigos, a leitura dos abstracts, e o consenso sobre os artigos que seriam incluídos foram realizados por três autores (LAF, GJO e TLDB).

## Resultados

### *Resultados da busca*

Ao fazer permutações com as palavras chave utilizadas para busca dos artigos nesse estudo foram encontrados: “Implant Surface” AND “Diabetes”=35, “Dental Implants” AND “Diabetes”= 146, “Implant Surface” AND “Hiperglycemia”=5 e “Dental Implants” AND “Hiperglycemia”= 12, totalizando 198 artigos científicos, sendo que 23 destes eram duplicatas. Após a exclusão das duplicatas, leitura dos títulos e abstracts, foram selecionados 37 artigos para leitura na íntegra. Após essa leitura, 3 artigos foram selecionados para serem descritos nessa revisão. A figura 1 expõe um fluxograma com os detalhes da seleção dos estudos para essa revisão.

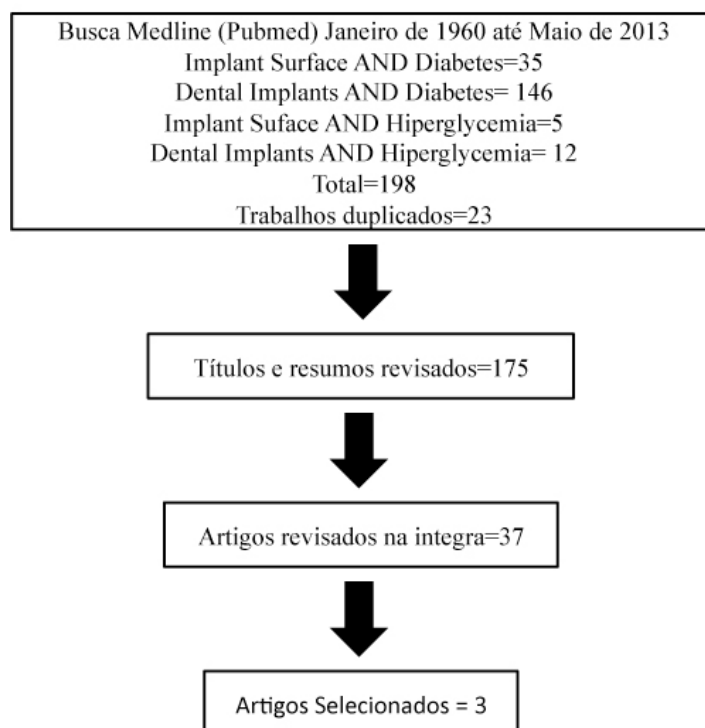


Figura 1- Fluxograma dos estudos selecionados para a revisão.

### ***Estudos Excluídos***

Dos 37 estudos que foram avaliados na íntegra, 34 foram excluídos por diferentes motivos, sendo que alguns deles se agrupavam em mais de uma justificativa porém apenas a mais relevante foi considerada. Segue abaixo a justificativa da exclusão desses artigos:

- Iyama et al., 1997 (15); Takeshita et al., 1997 (16); Nevins et al., 1998 (17); Balshi & Wolfinger, 1999 (18); Fiorellini et al., 1999 (19); Fiorellini et al., 2000 (11); Morris et al., 2000 (20); Abdulwassie & Dhanrajani, 2002 (21); Margonar et al., 2003 (22); Peled et al., 2003 (23); Siqueira et al., 2003 (24); Ottoni & Chopard, 2004 (25); Kwon et al., 2005 (26); McCracken et al., 2006 (27); Shyng et al., 2006 (28); Dowell et al., 2007 (8); Alsaadi et al., 2008 (10); Bugea et al., 2008 (29); Casap et al., 2008 (30); de Moraes et al., 2009 (31); Oates et al., 2009 (5); Turkyilmaz, 2010 (32); Wang et al., 2010a (33); Colombo et al., 2011 (7); Guimarães et al., 2011 (34); Kuchler et al., 2011 (35); von Wilmowsky et al., 2011 (36); Inbarajan et al., 2012 (37); Molon et al., 2012 (38) - Utilizaram apenas um tipo de superfície de implante

- Wang et al., 2010b (39); Han et al., 2012 (40); Zou et al., 2012 (41)- Utilizaram fatores de crescimento ou hormônios que não estavam agregados às superfícies dos implantes

-Farzad et al., 2002 (42); Tawil et al., 2008 (43)- Não apresentaram informações sobre os implantes utilizados.

### ***Revisão dos artigos incluídos***

Dos estudos selecionados, 2 deles foram realizados em humanos (3, 44) e apenas 1 em modelo animal (14). Dentro dos estudos em humanos, ambos tiveram essa

avaliação em modelo prospectivo (3, 44). No estudo de Olson et al (2000) (44), a variável dependente foi a análise de sobrevivência dos implantes após 5 anos de acompanhamento, enquanto no estudo de Khandelwal et al (2013) (3), a variável dependente foi a análise da estabilidade do implante após um período de acompanhamento de 16 semanas. Por outro lado, no estudo em animal as variáveis dependentes foram o contato osso/implante (COI) e a densidade óssea (DO), ambas avaliadas por histometria (14).

Com relação ao tipo de diabetes avaliado, ambos os estudos em humanos avaliaram portadores de diabetes tipo 2 (3, 44). O único estudo em animais aqui incluído empregou um modelo de indução que reproduz o DM tipo 1 (14). Com relação às superfícies de implantes que foram avaliadas, em dois estudos houve a comparação direta de superfícies SLA e SLActive (3, 14) e em um estudo houve a comparação das superfícies usinadas e liga de Ti-6Al-4V; superfície usinada com titânio comercialmente puro e com superfície modificada por plasma de spray de titânio (44). Devido à alta variabilidade metodológica entre os estudos, não foi possível a realização de metanálise dos dados. Segue abaixo uma breve descrição dos estudos que foram selecionados para serem discutidos nessa revisão.

Olson et al. (2000) (44) realizaram um estudo multidisciplinar prospectivo no qual foi avaliada a sobrevivência de implantes de dois estágios, instalados na região de sínfise mandibular em pacientes com DM tipo 2, após 5 anos de acompanhamento. Foram avaliados 178 implantes em 89 pacientes do sexo masculino, com idade entre 40 a 78 anos, edêntulos totais, que apresentavam DM tipo 2 compensado. Após a instalação das próteses do tipo overdenture, os pacientes foram avaliados nos períodos de 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 e 60 meses após a cirurgia, com relação a: 1-



mobilidade do implante (sim ou não); 2- periimplantite (sem, suave, moderada e severa); 3-profundidade de bolsa; 4-presença de placa, cálculo e 5-nível marginal. Esses parâmetros foram correlacionados a variáveis inerentes ao hospedeiro (controle glicêmico durante o período de avaliação) e ao implante (comprimento do implante, tipo de superfície). Foi verificado que, de 178 implantes, apenas 16 foram perdidos (taxa de sobrevivência de 91%), sendo que a taxa de perda para os diferentes sistemas de implantes foram 8 de 72 (11.1%) para implantes com superfície usinada e liga de Ti-6Al-4V; 4 de 42 (9,5%) para superfícies usinadas de titânio comercialmente puro e 4 de 64 (6.3%) para implantes com superfície modificada por plasma spray de titânio. Os resultados demonstraram que o tipo de superfície não influenciou na taxa de sobrevivência de implantes instalados em pacientes com DM tipo 2.

Khandelwal et al. (2011) (3) compararam, por meio de análise de frequência de ressonância (RFA), a estabilidade de implantes osseointegrados com superfícies SLA e SLActive em indivíduos com diabetes tipo 2 descompensado. 48 implantes foram instalados em 24 pacientes com DM tipo 2 descompensado, sendo que cada paciente recebeu dois implantes, sendo um com superfície SLA e outro com superfície SLActive, contralaterais na região posterior de mandíbula. A RFA foi avaliada nos períodos baseline e 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 16 semanas após a cirurgia. Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as 2 superfícies quanto à estabilidade, os autores destacaram que 47 dos 48 implantes apresentaram sucesso no que concerne à osseointegração, o que demonstra alta taxa de sucesso para ambas as superfícies avaliadas em pacientes com DM tipo 2 descompensado.

Schlegel et al. (2011) (14) avaliaram: 1- a formação óssea periimplantar em animais diabéticos comparados aos saudáveis; e 2- as diferenças entre as superfícies SLA e SLActive quanto à osseointegração nesse modelo animal. 16 mini-pigs foram utilizados nesse estudo, sendo 4 animais saudáveis (controle) e 12 animais diabéticos. Após 15 meses da indução do diabetes nos animais, 6 implantes foram instalados na calota de cada animal sendo 3 de superfície SLA e 3 SLActive, resultando em um total de 96 implantes instalados. Os animais foram sacrificados após 30 (2 controles e 6 diabéticos) e 90 dias (2 controles e 6 diabéticos) da instalação dos implantes. Os espécimes foram analisados histometricamente, quanto ao contato osso/implante (COI) e à densidade óssea (DO), e quanto à expressão das proteínas osteocalcina e colágeno tipo I, por imunistoquímica. Em relação ao contato osso/implante, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies para os animais controle, porém, em animais diabéticos a superfície SLActive demonstrou resultados superiores em relação à superfície SLA. Comparando-se animais controle e diabéticos, foi verificado que o COI foi sempre menor para os diabéticos, independente do tipo de superfície avaliada. Quanto à DO, esta foi maior para as superfícies SLActive aos 30 e 90 dias, tanto para animais saudáveis quanto para diabéticos. Além disso, a expressão de colágeno tipo I foi maior para superfícies SLA em comparação à superfície SLActive, em animais diabéticos. Os resultados indicam o efeito negativo do Diabetes mellitus não tratado sobre a osseointegração precoce de implantes dentários. Entretanto, pelo fato da superfície SLActive ter provocado uma aceleração no processo de osseointegração, sugere-se que modificações na superfície do implante podem melhorar o prognóstico desse tipo de tratamento em pacientes com diabetes.

## Discussão

O efeito do DM sobre a osseointegração ainda é pouco entendido, uma vez que existe divergência na literatura quanto à contraindicação real ou relativa para a instalação de implantes osseointegrados em portadores de diabetes (3, 11, 32, 36, 38, 44). Apesar de não existirem parâmetros consistentes sobre o grau de osseointegração necessário para se obter sucesso clínico, a pesquisa de novas superfícies de implantes tem sido executada com o intuito de aumentar e/ou acelerar o contato osso/implante (12), sendo que esses benefícios poderiam ser mais claros para pacientes com condições ou doenças que alteram o metabolismo ósseo (14).

Existe uma grande gama de pesquisas que avaliaram o efeito do DM sobre a osseointegração, porém foi verificado na presente revisão que apenas 3 delas avaliaram o efeito de diferentes superfícies sobre a osseointegração no diabetes (3, 14, 44). Além disso, há uma grande heterogeneidade metodológica entre esses estudos, o que não permitiu uma metanálise dos dados. Essas variações metodológicas são provavelmente responsáveis pelas diferentes conclusões encontradas nos estudos incluídos nessa revisão.

Em dois estudos foi verificada a ausência de diferença entre as superfícies de implantes (3, 44). Apenas um estudo demonstrou a superioridade de uma superfície específica SLActive em relação à outra SLA (14). Vários fatores podem ser descritos como responsáveis por essa diferença nos resultados encontrados.

Um primeiro fator que pode justificar tais diferenças é o tipo de modelo utilizado. Outro importante fator de influência é o tipo de análise empregada. O estudo que detectou diferenças entre as superfícies foi realizado em mini-pigs e o grau

de osseointegração foi analisado histometricamente (14). As análises histométricas são capazes de identificar pequenas diferenças entre os grupos que podem não consistir em uma diferença clínica significativa, e isso pode justificar a superioridade encontrada na superfície SLActive para os parâmetros BIC e DO (14). O estudo de Khandelwal et al (2011) (3), embora tenha comparado as mesmas superfícies, não encontrou diferença nos resultados. Entretanto, deve-se chamar a atenção para as diferenças quanto ao modelo (animal x humano), à forma de avaliação (histometria x RFA), ao sítio de instalação dos implantes (calota x mandíbula) e ao tempo de avaliação pós-instalação dos implantes.

Um ponto importante também a ser discutido é quanto ao grau de controle metabólico. Estudos em animais são mais eficazes no controle da padronização dos níveis glicêmicos. Têm sido verificado que o nível de controle metabólico de pacientes com DM durante estudos que avaliaram osseointegração tem altas taxas de variação em boa parte da amostra (8), sendo que um indivíduo que no início do estudo apresentava bom controle glicêmico poderá apresentar uma descompensação no decorrer do estudo, o que pode reduzir a possibilidade de se encontrar diferenças estatisticamente significantes entre as diferentes superfícies avaliadas (44).

O tipo de DM apresentado também é fator importante no resultado final da osseointegração, sendo que os diferentes tipos de DM estudados nos artigos incluídos na revisão também foi um fator que impossibilitou a comparação direta dos estudos. Os estudos clínicos avaliaram pacientes com DM tipo 2 (3, 44) enquanto que o estudo em modelo animal incluído na presente revisão fez uso de um fármaco (streptozotocina), que é tóxico às células  $\beta$ -pancreáticas, o que representa um modelo de indução de DM tipo 1 (14).

Outra fonte de heterogeneidade foram os diferentes tipos de superfícies avaliadas nos estudos. Dois dos estudos selecionados utilizaram os mesmos tipos de superfície (3, 14) enquanto que o outro avaliou implantes com superfície usinada e liga de Ti-6Al-4V, superfície usinada com titânio comercialmente puro e modificada por plasma spray de titânio (44). Como citado anteriormente, mesmo os dois estudos que avaliaram superfícies iguais apresentaram diferenças no modelo de estudo, tipo de análise, tempo de acompanhamento e a presença de um grupo controle (3, 14). A superfície usinada, que normalmente é usada como referência de comparação em estudos que avaliam o efeito de modificações de superfícies, foi utilizada somente em um estudo (44). Dessa forma, as grandes variações impossibilitaram a comparação direta dos resultados.

Outros fatores que dificultaram a comparação dos dados dos estudos clínicos foram a ausência de grupo controle sem DM, a ausência de aleatorização quanto ao tipo de implante a ser inserido, os diferentes métodos de análise (RFA x Análise de sobrevivência) e os diferentes períodos de acompanhamento (16 semanas x 5 anos) (3, 44). Apesar de ambos os estudos relatarem ausência de diferença entre as superfícies empregadas, entende-se que a avaliação do impacto das modificações de superfície na ausência de um grupo sem DM ou da comparação da superfície modificada com uma superfície usinada, pode levar a conclusões precipitadas. A importância dessas comparações pode ser confirmada pelos resultados de estudos clínicos que avaliaram apenas uma superfície de implante em indivíduos diabéticos, com resultados conflitantes quanto ao sucesso clínico do tratamento para esses pacientes. Como exemplo, temos estudos com pacientes diabéticos que empregaram apenas implantes com superfície usinada e demonstraram pior taxa de sobrevivência desses implantes

(11, 20), enquanto estudos onde foi utilizada apenas a superfície do implante modificada demonstraram melhores taxas (8, 32, 37).

### **Conclusão**

Pode-se concluir que apesar dos benefícios das modificações de superfície em indivíduos com DM apresentar plausibilidade biológica, ainda existem poucas evidências dos benefícios dessas modificações, necessitando portanto de estudos comparativos.

### **Referências**

1. Arvidson K, Esselin O, Felle-Persson E, Jonsson G, Smedberg JI, Soderstrom U. Early loading of mandibular full-arch bridges screw retained after 1 week to four to five Monotype implants: 3-year results from a prospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:693-703.
2. Branemark 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.
3. Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C. Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 Diabetes mellitus - a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res* 2011.
4. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-170.

5. Oates TW, Dowell S, Robinson M, McMahan CA. Glycemic control and implant stabilization in type 2 diabetes mellitus. *J Dent Res* 2009;88:367-371.
6. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321.
7. Colombo JS, Balani D, Sloan AJ, Crean SJ, Okazaki J, Waddington RJ. Delayed osteoblast differentiation and altered inflammatory response around implants placed in incisor sockets of type 2 diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:578-586.
8. Dowell S, Oates TW, Robinson M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study. *J Am Dent Assoc* 2007;138:355-361; quiz 397-358.
9. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol 2000* 2000;23:73-77.
10. Alsaadi G, Quirynen M, Michiles K, Teughels W, Komarek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. *J Clin Periodontol* 2008;35:51-57.
11. Fiorellini JP, Chen PK, Nevins M, Nevins ML. A retrospective study of dental implants in diabetic patients. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2000;20:366-373.
12. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-533.

13. Jimbo R, Coelho PG, Vandeweghe S, Schwartz-Filho HO, Hayashi M, Ono D, et al. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration to nanostructured calcium phosphate-coated implants. *Acta Biomater* 2011;7:4229-4234.
14. Schlegel KA, Prechtel C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmsowky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res* 2011.
15. 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;68:1169-1175.
16. 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;68:180-185.
17. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-629.
18. Balshi TJ, Wolfinger GJ. Dental implants in the diabetic patient: a retrospective study. *Implant Dent* 1999;8:355-359.
19. 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;10:362-368.
20. Morris HF, Ochi S, Winkler S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2000;5:157-165.
21. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. *Implant Dent* 2002;11:83-86.

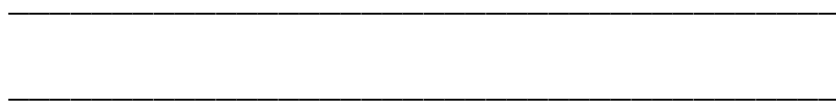


22. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent* 2003;12:333-339.
23. Peled M, Ardekian L, Tagger-Green N, Gutmacher Z, Machtei EE. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. *Implant Dent* 2003;12:116-122.
24. 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;12:242-251.
25. 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.
26. 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;76:621-626.
27. 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.
28. Shyng YC, Devlin H, Ou KL. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *Int J Prosthodont* 2006;19:513-514.
29. Bugea C, Luongo R, Di Iorio D, Cocchetto R, Celletti R. Bone contact around osseointegrated implants: histologic analysis of a dual-acid-etched surface implant in a diabetic patient. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:145-151.

30. Casap N, Nimri S, Ziv E, Sela J, Samuni Y. Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in *Psammomys obesus*. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:458-464.
31. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E, Jr., Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:796-801.
32. Turkyilmaz I. One-year clinical outcome of dental implants placed in patients with type 2 diabetes mellitus: a case series. *Implant Dent* 2010;19:323-329.
33. Wang F, Song YL, Li DH, Li CX, Wang Y, Zhang N, et al. Type 2 diabetes mellitus impairs bone healing of dental implants in GK rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;88:e7-9.
34. Guimaraes RP, de Oliveira PA, Oliveira AM. Effects of induced diabetes and the administration of aminoguanidine in the biomechanical retention of implants: a study in rats. *J Periodontal Res* 2011;46:691-696.
35. Kuchler U, Spilka T, Baron K, Tangl S, Watzek G, Gruber R. Intermittent parathyroid hormone fails to stimulate osseointegration in diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:518-523.
36. von Wilmowsky C, Stockmann P, Harsch I, Amann K, Metzler P, Lutz R, et al. Diabetes mellitus negatively affects peri-implant bone formation in the diabetic domestic pig. *J Clin Periodontol* 2011;38:771-779.
37. Inbarajan A, Veeravalli PT, Vaidyanathan AK, Grover M. Short-term evaluation of dental implants in a diabetic population: an in vivo study. *J Adv Prosthodont* 2012;4:134-138.

38. de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res* 2012.
39. Wang F, Song YL, Li CX, Li DH, Zhang HP, Ma AJ, et al. Sustained release of insulin-like growth factor-1 from poly(lactide-co-glycolide) microspheres improves osseointegration of dental implants in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2010;640:226-232.
40. Han Y, Zeng Q, E L, Wang D, He H, Liu H. Sustained topical delivery of insulin from fibrin gel loaded with poly(lactic-co-glycolic Acid) microspheres improves the biomechanical retention of titanium implants in type 1 diabetic rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:2299-2308.
41. Zou GK, Song YL, Zhou W, Yu M, Liang LH, Sun DC, et al. Effects of local delivery of bFGF from PLGA microspheres on osseointegration around implants in diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:284-289.
42. Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent* 2002;11:262-267.
43. Tawil G, Younan R, Azar P, Sleilati G. Conventional and advanced implant treatment in the type II diabetic patient: surgical protocol and long-term clinical results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:744-752.
44. 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;15:811-818.

## **4 CAPÍTULO 2**



\*Artigo submetido para publicação no periódico Quintessence Internacional

## ***4 CAPÍTULO 2***

### **Fluoride-treated implant surfaces enhancing removal torque values in diabetic rats: a biomechanical study**

Lucas Amaral Fontanari, MSc<sup>a</sup>; Rubens Spin-Neto, PhD<sup>b</sup>; Tulio Luiz Durigan Basso, MSc<sup>a</sup>; Silvana Regina Perez Orrico, PhD<sup>a</sup>; Jackeline Tsurumaki, DDS<sup>a</sup>; Carlos Nelson Elias, PhD<sup>c</sup>; Elcio Marcantonio Junior, PhD<sup>a</sup>; Jose Eduardo Cesar Sampaio, PhD<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Dentistry – Oral Radiology, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

<sup>c</sup>Biomaterials Laboratory, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**Running title:** Fluoride-treated implant surfaces in diabetic rats

**Key Words:** fluoride; implant surface; diabetes; removal torque evaluation

#### ***Corresponding author***

Rubens Spin-Neto

Department of Dentistry, Aarhus University

Vennelyst Blvd 9, 8000, Aarhus, Denmark.

E-mail: rsn@odont.au.dk

## **Fluoride-treated implant surfaces enhancing removal torque values in diabetic rats: a biomechanical study**

### **Abstract**

**Objectives:** To evaluate, biomechanically, fluoride-treated implant surfaces in rats with uncontrolled diabetes, testing the hypothesis that the beneficial effect of these surfaces would trespass an impaired bone formation.

**Materials and Methods:** Ninety Wistar rats, divided into three experimental groups (control - C, rats with uncontrolled diabetes – D, and rats with insulin-controlled diabetes – CD) were used in this study. One month after diabetes induction, each animal received two titanium implants in the tibiae (4.0 x 2.2 mm): one had a machined (M), and the other had a fluoride-treated (F) surface. Implants' removal torque value (RTV) was assessed after 2, 4 and 6 weeks, and a comparison among the groups, periods and implant surfaces was carried out. **Results:** For M implants, RTV for D group were lower ( $p < 0.05$ ) than those achieved in C group, but similar to CD group, 4 and 6 weeks after implant placement. For F implants, D group presented the lower values ( $p < 0.05$ ) when compared to the other two groups. When tested surfaces were compared in the same period of evaluation, F performed better than M ( $p < 0.0001$ ), for all evaluated groups.

**Conclusions:** Fluoride-treated surfaces lead to higher RTV than machined implants, in all periods of evaluation and for all evaluated groups. The RTV achieved in animals with uncontrolled diabetes indicate that the benefits of this type of surface might lead to a better biomechanical performance for the implants installed in cases of possible impaired bone formation and remodeling.

## Introduction

According to the American Diabetes Association (1), Diabetes mellitus<sup>43</sup> is one of the most relevant public-health problems of the last decade, regarding the number of affected people, the chronic problems caused in those people, and the costs related to both the control of the disease itself and its related systemic complications. The mechanisms of bone formation and remodeling are markedly compromised in diabetic patients (2), including those responsible for the osseointegration of dental implants (3), such as the impaired synthesis collagenic connective tissue (4). Literature has shown that DM, when not controlled, negatively affects the osseointegration of implants in both animal (5, 6) and human (7) study models.

Diabetic patients with good glycemic control can be treated as healthy subjects, and will present high implant-success rates (5, 7, 8). But in many cases a constant and rigid glycemic control is difficult to achieve, and alterations in the glucose levels following the period in which the osseointegration of implants will take place might lead to fails (9). In these cases, using implants with better osteoinductive properties can be a viable solution. The manipulation of implants' surfaces in order to achieve faster and stronger bone-to-implant contact is a feasible approach (10). Among the techniques used in that aim, fluoride-ions addition is a recent and promising technic to enhance the biocompatibility (11), stimulate osteoblast proliferation (12) and enrich bone formation surrounding the implants at early healing stages (13). Therefore, it is plausible to hypothesize that implants with fluoride-treated surface would be useful in cases in which bone formation and remodeling are impaired, as seen in patients with uncontrolled diabetes.

In this study our objective was to evaluate the effect of using implants with fluoride-treated surfaces in rats with controlled and uncontrolled diabetes, using biomechanical evaluation, testing the hypothesis that the beneficial effect of these surfaces would enhance the biomechanical performance of implants installed in cases of possible impaired bone formation and remodeling.

### **Methods and Materials (Apêndice)**

The study protocol was approved by the committee of ethics for animal experimentation of Araraquara Dental School, Univ. Estadual Paulista, Araraquara, Brazil (protocol nº10/2011). All surgical and laboratorial procedures were performed in the animal facilities of the Department of Periodontology, Araraquara Dental School (UNESP – Univ. Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil.

#### *Animals*

Ninety 3 to 4-week old male Wistar rats, weighing 150–200 g were used. The rats were kept in a room with a 12h light/dark cycle and controlled temperature. They were fed a standard laboratory rodent diet, and after a two-week acclimatization period, they were randomly assigned to one of three experimental groups (30 animals in each group), according to their systemic condition: control group (“C”, normoglycemic rats), rats with uncontrolled diabetes (“D”), and rats with insulin-controlled diabetes (“CD”).

#### *Diabetes mellitus induction*

Animals from D and CD groups were administered a 50 mg/kg body mass intraperitoneal injection of Streptozotocin, dissolved in citrate buffer pH 4.5. Animals from the C groups received saline intraperitoneal injections (14). Twenty-four hours



following the injections, blood glyceic levels were evaluated to certify diabetes induction. While glyceic levels lower than 180 mg/dl indicated normality, initial glyceic levels higher than 300 mg/dl were used to define the diabetic condition (14). To assure that diabetes induction would mimetize the systemic condition of an installed disease, a one-month period separated the diabetes induction phase from the baseline of the study. Considering the characterists of the animals used in the study, this one-month period would represent almost 3 years for humans (15). Weekly evaluations on the glyceic levels were done during the study, to assure this condition.

#### *Insulin treatment*

Animals from CD group were administered subcutaneous injections containing 2.5 – 3 U of insulin (Humulin NPH U-100, Lilly, Fegershein, France), twice a day, starting after the certification of the diabetic condition until the end of the study (16). Animals from C and D groups were administered subcutaneous injections of sterile saline, using the same protocol. To guarantee the glyceic condition in each group, animals with glyceic levels lower than 180 mg/dl were kept in CD group, while glyceic levels higher than 300 mg/dl were used to keep the animals in D group.

#### *Implant Placement*

Implants were installed one month after diabetes induction, and this was considered as the baseline of the biomechanical study. Animals were anesthetized by an intramuscular injection of xylazine (4 mg/kg body weight, Francotar, Virbac do Brasil, Sao Paulo, Brazil) and ketamine (8 mg/kg body weight, Vyrbaxil, Virbac do Brasil, Sao Paulo, Brazil). After aseptic preparation (cleaning of the surfaces using

1% Chlorhexidine gel), incisions of approximately 3 cm in length were performed bilaterally at the internal side of the hind-leg, just below the knee. After gentle dissection, the bone surface of the tibial metaphysis was exposed. Unicortical implant beds were prepared using a progressive sequence of spiral drills under generous sterile saline cooling (approximately 10 - 15° C). Each animal received two implants (4.0 mm in length and 2.2 mm in diameter, Conexão Sistemas de Prótese Ltda., SP, Brazil), one in each tibial metaphysis. One of the implants had a conventional (machined, “M”) surface, while the other was fluoride-treated. According to the manufacturer, this fluoride-treated (“F”) surface was achieved after an acid attack ( $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HCl} + \text{HNO}_3$ ) followed by the implant immersion in a  $\text{Na}^+$  and  $\text{F}^-$  solution, which resulted in values of  $\text{Ra}=1,08 \pm 0,16$ .

In the sequence, the soft tissues were repositioned and sutured to achieve primary closure (Seda 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Each animal received an intramuscular injection of 0.1ml/kg penicillin G-benzathine (Pentabiotico Veterinario Pequeno Porte, Fort Dodges Saude Animal, Campinas, Brazil) and 0.1 ml/kg Metamizol as analgesic (Dipirona Ibaso 50%, Laboratorio Ibaso, São Paulo, Brazil) postoperatively.

Each group of animals was divided into three subgroups (10 animals in each group) for euthanasia at 2, 4 or 6 weeks postoperative, in a total of 10 animals / group / period of evaluation, providing a sample of 10 implants of each surface for each group / period of evaluation. Sample size calculation was carried out based in the results of previous studies using diabetic animals (16), and a sample of 7 samples / group / period would already provide a 90% statistical power.

*Removal torque value (RTV) evaluation*

After 2, 4 and 6 weeks, the implants were surgically exposed under general anesthesia. A special key was adapted the prosthetic connector of the implant, and connected to a digital torque meter (TQ-680, Instrutherm, São Paulo, Brazil). An anti-clockwise movement was performed to break the bone-implant interface. The maximal torque necessary for manual removing each implant was measured in N cm, and assigned as the RTV for that implant.

#### *Data Analysis*

Data from glycemic levels, body weight and RTV of each group / period of evaluation were expressed as means and standard deviations. Commercially available software (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) was utilized for comparisons between groups and for drawing the graphics. Data was subjected to normality test analysis (Shapiro-Wilk normality test). For all evaluated parameters, data were normally distributed, and therefore paired t-test was used for intra-group comparisons, and ANOVA followed by Tukey post-test was used for multiple inter-group comparisons. Statistical significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

### **Results**

#### *Systemic data*

At the day that the diabetic condition was certificated, animals from all groups presented statistically similar body weight. At the baseline and after 2, 4 and 6 weeks, rats from D group showed statistically lower ( $p < 0.0001$ ) body weight when compared to C and CD rats. Intra-group comparison showed that CD animals kept gaining weight up to the 6-weeks period of evaluation. In D group, after a significant body

weight increase after 2 weeks, values reached lower levels in week 4 and stabilized until the end of the experiment. These data are shown in Figure 1.

Regarding the glycemic levels, and proving the correct induction of the diabetic condition, at the day that the diabetic condition was certificated animals from D and CD group showed statistically higher values when compared to C-group animals ( $p < 0.0001$ ). At baseline and also considering the 2-, 4- and 6-weeks periods of evaluation, the glycemic levels for the D group were always significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than C and CD groups, which were always similar, proving the efficiency of the insulin therapy for CD group. Intra-group evaluation showed that, in C group the glycemic levels remained constant during all experiment. In CD group, the glycemic peak was achieved with the induction of the diabetic condition and was significantly reduced after the initiation of the insulin treatment. In D group, a tendency for an increasing glycemic level was seen from baseline to the latest periods of evaluation, but this was not statistically significant when animals from the 4- and the 6-weeks period of evaluation were compared. These data are shown in Figure 2.

#### *Removal torque values (RTV)*

RTV data are shown in Table 1. Statistic evaluation showed that for M implants, 2 weeks after implant placement, RTV were similar among the groups, but after 4 and 6 weeks the values for C group were higher ( $p < 0.05$ ) than those achieved in CD and D groups, which were statistically similar. For F implants, the 2-week evaluation period showed statistically similar values for C and CD groups, and both were higher ( $p < 0.05$ ) than D group. At the 4- and 6-weeks evaluation period, D group also presented lower values ( $p < 0.05$ ) when compared to the other groups. When tested surfaces were compared in the same period of evaluation, F always performed better

than M ( $p < 0.0001$ ), for all groups. Intragroup comparison showed that, except for the CD group when comparing 2 and 4 weeks, removal torque values upraised through time (from 2 to 4 and from 4 to 6 weeks,  $p < 0.01$ ).

Considering the last period of evaluation (6 weeks), it is important to notice that RTV achieved for F implants in D group are also statistically higher ( $p < 0.01$ , *t*-test) than those achieved by M implants in C or CD groups.

## **Discussion**

In our study, the hypothesis that fluoride-treated surfaces would enhance bone formation around titanium implants in diabetic animals was accepted, based on the fact that fluoride-treated surfaces lead to higher RTV than machined implants, in all periods of evaluation and for all evaluated groups.

The elevated glycemic level associated with Diabetes mellitus interacts with several plasmatic proteins, originating the advanced glycation end-products (AGEs), which will therefore interact with the receptors for advanced glycation end-products (RAGEs), present in an extensive hall of cell populations, and inducing alterations in cellular metabolism (17). These cell disturbances may be regarded as adverse factors on implant-dentistry.

Animal studies have shown that Diabetes mellitus<sup>43</sup> negatively interferes in bone remodeling around titanium implants, due to the reduced and slower bone formation related to this systemic condition. According to literature, one of the most affected mechanisms is the synthesis of collagenic connective tissue (4). This leads to a poorly-organized and less-dense bone formed around the implants, and therefore to a smaller bone-to-implant contact (8, 18). In opposition to that idea, literature also

shows studies in which DM did not decrease observed osseointegration parameters (19, 20).

Clinical studies report elevated implant-success rates in well-controlled diabetic patients (2), suggesting that a strong insulin-control of the systemic condition would be a manner to put these patients in the hall of “healthy” subjects. Although controlling the glyceimic level of patients would be the ideal situation, an effective and long-lasting glyceimic control is difficult to achieve, and therefore in these cases higher implant failures rates could exist (9).

A plausible attempt to avoid that the impaired bone healing following glyceimic level alterations would lead to a poor biomechanical environment around installed implants would be the use of modified titanium surfaces. There are some studies in literature which showed that some modified titanium surfaces can enhance the osseointegration of implants even without control of the diabetic condition (21, 22). Modified surfaces can accelerate the bone remodeling process (3), enhancing bone-to-implant contact (10), and positively influencing several cellular mechanisms, such as adhesion, migration, differentiation and protein expression (such as collagen) in the cells directly in contact with the titanium surface (23, 24). Among the suggested techniques for titanium surface modification, the addition of fluoride-ions is known to enhance osteoblast proliferation (12) and enrich bone formation surrounding the implants at early healing stages (13).

Until the present moment, this is the first study in literature in which implants with fluoride-treated surfaces were used in animals with established diabetes. In this study, Streptozotocin injections were used to induce the diabetic state in the rats. Streptozotocin is a toxic glucose analogue which accumulates in pancreatic beta cells,

and is splitted into glucose and methylnitrosourea moiety. Methylnitrosourea moiety modifies biological macromolecules, fragments DNA and destroys the beta cells, causing a state of insulin-dependent diabetes (25).

In the present paper, by using a biomechanical evaluation (based on RTVs) of fluoride-treated implant surfaces in rats with controlled and uncontrolled diabetes, we tested the possible beneficial effects of these surfaces when in the presence of the challenges of an impaired bone formation and remodeling. The removal torque of an implant is directly correlated to the amount of histological bone-to-implant contact (“osseointegration”), being influenced by both the quality and the quantity of bone surrounding the implant (26, 27). The results assessed by this method of evaluation are highly accepted in literature, as an indicator of osseointegration (28). RTV will increase through time reflecting progressive bone remodeling (27).

Our results showed that, for M implants, RTV for D group were lower ( $p < 0.05$ ) than those achieved in C group, but similar to CD group, 4 and 6 weeks after implant placement, suggesting that diabetes can affect bone remodelling even in controlled animals. When fluoride-treated implants were used, D group also presented the lower values when compared to the other two groups, which were statistically similar, both in 4 and 6 weeks after implant placement. A previous study has shown that the impairment in bone repair/remodeling around titanium implants might be primarily linked to continuing insulin deficiency, rather than to secondary hyperglycemia occurring in the diabetic rats (29). In any case, independently if the pitfall in bone turnover is due to hyperglycemia or insulin deficiency, it is suggested that the adequate insulin-treatment would bring the bone healing back to

physiologically normal values (8), although in our study this was seen only for F-treated implants.

When tested surfaces were compared in the same period of evaluation, F always performed better than M, for all groups. This might be related to the fact that ion modification of the topographically enhanced titanium surface can affect bone formation by modulating cell activities at relatively early stages in wound healing at the implant surface. Fluoride increases alkaline phosphatase activity and increases collagen synthesis, leading to a better biomechanical scenario for F-treated implants (30). Recent findings in literature suggest that fluoride would enhance bone formation through the modulation of tissue responses after implantation, determining the success of the healing process (31). In addition, genes such as the Distal-less homeobox-2 and Tuftelin-1, were reported as being more expressed in human osteoblasts in response to fluoride treatment (31). The same study have shown other genes that would be stimulated by both fluoride and titanium surface roughness, such as Collagen type I and parathyroid hormone-like hormone, especially in the initial days following implantation. Genes like Collagen type I are among the most assessed markers of osteoblast activity, being classified as an early responsive gene to both roughness and fluoride treatment (32, 33). According to literature, genes such as Distal-less homeobox-2 and Tuftelin-1 would also be up-regulated in the presence of bone morphogenic protein-2, and are also believed to directly activate Runx2 and Osterix genes, directly connected to the bone formation mechanism (34). Parathyroid hormone-like hormone gene is a modulator of bone remodeling, and a stimulator of bone formation, promoting osteoblast differentiation and survival (35). These mechanisms, acting in conjunct, could be related to the results found in our study.



Based in our results, it is still unknown if after longer healing periods (such as 8 or 10 weeks), RTV would equalize in all groups. Further periods of evaluation were not used in the present study due to the progressive impairment caused by the DM condition, leading to high morbidity levels among animals after the 6-weeks period of evaluation.

For the majority of groups and both tested surfaces, RTV upraised through time. Interestingly, the effect of F surfaces was beneficial to the point that, in the latest period of evaluation (6 weeks), RTV in D group, although inferior to the other groups, were statistically higher than those achieved by M implants in C and CD groups.

The present results might indicate fluoride-treated surfaces as a useful implant surface for patients with higher susceptibility to bone remodeling derangements such as diabetic ones. However, it is important to emphasize that the used implants were not exposed to the intra-oral medium and therefore can not be directly extrapolated to dental implants. Further studies are also needed in order to better understand the mechanisms behind these results.

In conclusion, in our animal model, fluoride-treated surfaces lead to higher RTV, in all periods of evaluation and for all groups, than regular (machined) surfaces. The higher RTV values found even in diabetic animals indicate that the benefits of this type of surface in enhancing the biomechanical performance of implants, might be useful for conditions associated with impaired bone formation and remodeling.

### **Acknowledgements**

This study was financed by the Brazilian agencies Fapesp (2010/16907-7). Authors would also like to thank the company Conexão Sistemas de Prótese Ltda (SP, Brazil) for providing the used implants.

## References

1. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 1:S55-60.
2. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol 2000* 2000;23:73-77.
3. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67:932-949.
4. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1981;30:670-677.
5. Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. *J Periodontol* 2009;80:1719-1730.
6. de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res* 2012.
7. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:97-103.

8. Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmousis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:587-599.
9. Oates TW, Huynh-Ba G, Vargas A, Alexander P, Feine J. A critical review of diabetes, glycemic control, and dental implant therapy. *Clin Oral Implants Res* 2011.
10. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:11-19.
11. Huang HH. Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials* 2003;24:275-282.
12. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. The effects of fluoride on osteoblast progenitors in vitro. *J Bone Miner Res* 1990;5 Suppl 1:S101-105.
13. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000;84:522-534.
14. 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:E340-347.
15. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005;21:775-777.
16. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E, Jr., Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:796-801.
17. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms

underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol 2000* 2000;23:50-62.

18. 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;12:333-339.

19. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-629.

20. 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;15:345-354.

21. Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C. Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 Diabetes mellitus - a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res* 2011.

22. Schlegel KA, Prechtel C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmsky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res* 2011.

23. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-413.

24. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:333-344.

25. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-226.

26. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti FH, Jr., Alba RC, Jr., Marcantonio E, Jr. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol* 2003;74:976-981.
27. 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.
28. Atsumi M, Park SH, Wang HL. Methods used to assess implant stability: current status. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:743-754.
29. 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;12:242-251.
30. Elias CN. Factors Affecting the Success of Dental Implants. In: Turkyilmaz I (ed). *Implant Dentistry -- A Rapidly Evolving Practice*: Intech, 2010:319-364.
31. Ramis JM, Taxt-Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Ellingsen JE, Monjo M. Identification of early response genes to roughness and fluoride modification of titanium implants in human osteoblasts. *Implant Dent* 2012;21:141-149.
32. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:650-656.
33. Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Ellingsen JE. In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials* 2008;29:3771-3780.

34. Harris SE, Guo D, Harris MA, Krishnaswamy A, Lichtler A. Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci* 2003;8:s1249-1265.
35. Bisello A, Horwitz MJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein: an essential physiological regulator of adult bone mass. *Endocrinology* 2004;145:3551-3553.

**Table 1:** Removal torque values, expressed in means and standard deviations, according to group (C – control, CD – controlled diabetic, D – diabetic), period of evaluation and implant surface (M – machined, F – fluoride treated)

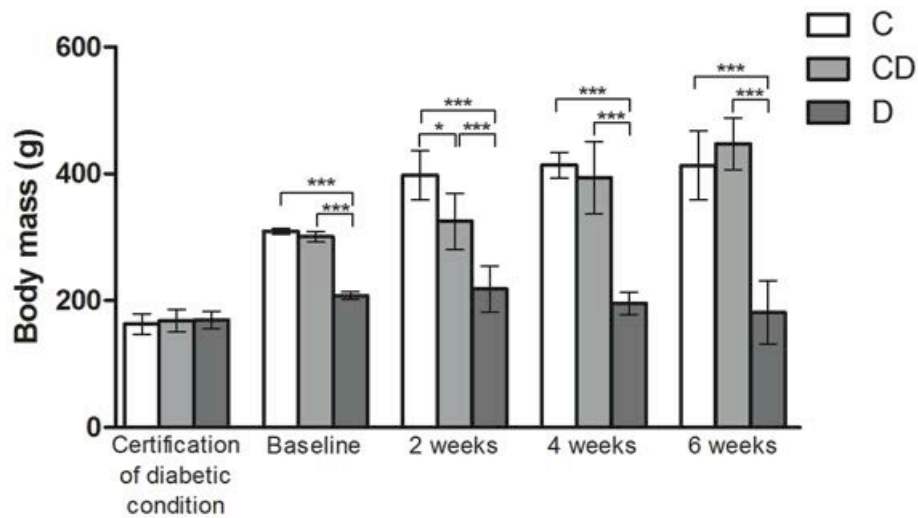
	<i>2 weeks</i>		<i>4 weeks</i>		<i>6 weeks</i>	
	<i>M</i>	<i>F*</i>	<i>M</i>	<i>F*</i>	<i>M</i>	<i>F*</i>
<i>C</i>	1.53±0.73	3.71±0.55 <sup>a</sup>	2.86±0.71 <sup>a,b</sup>	7.74±2.06 <sup>a,b</sup>	3.79±0.78 <sup>a,b</sup>	11.78±1.87 <sup>a</sup>
<i>CD</i>	1.46±0.56	3.80±1.6 <sup>a</sup>	1.73±0.68	4.71±1.29 <sup>a</sup>	2.87±0.94	9.64±2.69 <sup>a</sup>
<i>D</i>	1.06±0.33	2.49±0.81	1.62±0.51	3.71±0.77	2.26±0.46	5.24±1.06

\*Different from the M surface, in all groups ( $p < 0.0001$ , paired t-test); <sup>a</sup>Different from the Diabetic group, in the same period of evaluation and considering the same surface ( $p < 0.05$ , ANOVA followed by Tukey test); <sup>b</sup>Different from the Controlled-diabetic group, in the same period of evaluation and considering the same surface ( $p < 0.05$ , ANOVA followed by Tukey test).

## Figures and figure legends

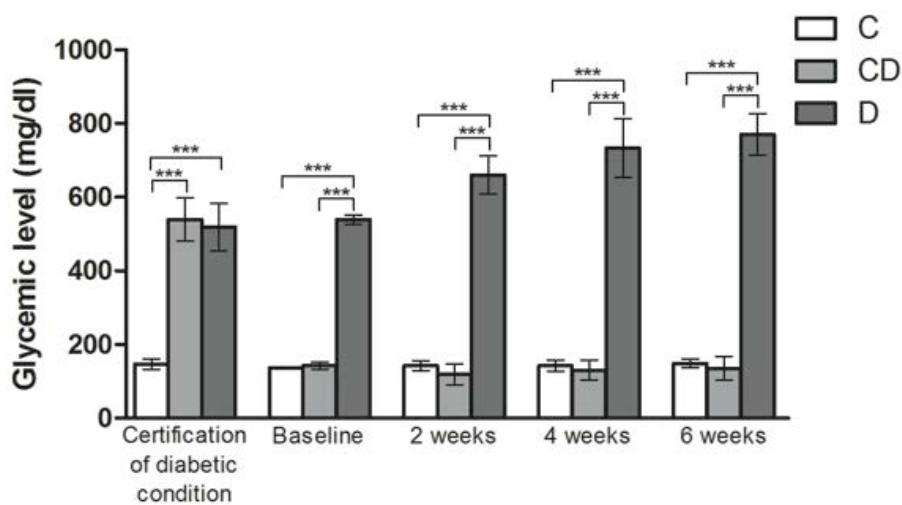
**Figure 1:** Means (bars) and standard deviations (error bars) for animals' body mass (g).

(\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*\*)  $p < 0.0001$ .



**Figure 2:** Means (bars) and standard deviations (error bars) for animals' glycemic levels (mg/dl).

(\*\*\*)  $p < 0.0001$ .





## **5 CAPÍTULO 3**

---

---

\*Artigo será submetido para publicação no periódico Quintessence Internacional

### **5 CAPÍTULO 3**

#### **Efeito de uma superfície modificada por fluoretos sobre a osseointegração de implantes em ratos diabéticos**

Lucas Amaral Fontanari, MSc<sup>a</sup>; Rubens Spin-Neto, PhD<sup>b</sup>; Tulio Luiz Durigan Basso, MSc<sup>a</sup>; Silvana Regina Perez Orrico, PhD<sup>a</sup>; Vânia Ortega Gutierrez MSc<sup>c</sup>; Carlos Nelson Elias, PhD<sup>d</sup>; Elcio Marcantonio Junior, PhD<sup>a</sup>; Jose Eduardo Cesar Sampaio, PhD<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Dentistry – Oral Radiology, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

<sup>d</sup>Biomaterials Laboratory, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar, por meio de histometria, o efeito de uma superfície de implante modificada por fluoretos sobre a osseointegração em ratos diabéticos. **Material e Métodos:** 90 ratos Wistar foram divididos em 3 grupos experimentais (grupo controle-C, ratos saudáveis; grupo DC-animais com diabetes controlado por insulina; grupo D-animais com diabetes descompensado. Após um mês da indução do diabetes, cada animal recebeu 2 implantes na tíbia (4.0 x2.2mm): um com superfície maquinada (M) e outro com superfície modificada com fluoreto (F). O contato osso-implante (BIC) e o percentual de preenchimento ósseo entre as roscas (BAFO) foram avaliados após 2, 4 e 6 semanas. O teste t-não pareado foi utilizado para comparação intra-grupos e o teste Anova complementado por teste de Tukey foi utilizado para comparações entre os grupos. O nível de significância foi definido em 5% ( $p < 0.05$ ). **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando o BIC foi analisado, independente da superfície utilizada. Quando o BAFO foi analisado, observou-se diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em 4 semanas para os grupos C e DC em comparação ao grupo D, apenas para superfície M. Na análise intra-grupos, a superfície F apresentou tendência a maiores valores de BAFO para os 3 períodos de avaliação no grupo D, em comparação a superfície M. **Conclusões:** O diabetes mellitus afetou negativamente a osseointegração, entretanto a aplicação de insulina foi capaz de reverter esse efeito. A superfície F foi capaz de reverter de forma sutil o efeito negativo do diabetes descompensado sobre o percentual de preenchimento ósseo entre as roscas.

## Introdução

Implantes dentais são uma forma efetiva de reposição de dentes perdidos e ancoragem de próteses. Essa modalidade de reabilitação é altamente previsível em

pacientes saudáveis, com taxas de sucesso de 95.9 a 97.9% relatada após 10 anos (1-4), fundamentada pelo conceito de osseointegração. A osseointegração é definida como o contato direto do tecido ósseo vivo com o metal de um implante em função, observado em microscopia óptica (5).

Biocompatibilidade do material, técnica cirúrgica utilizada para instalação, desenho do implante, condições das cargas aplicadas e qualidade da superfície utilizada são alguns fatores, relacionados ao implante, que podem ser controlados para se alcançar a osseointegração (6). No entanto, fatores relacionados à capacidade reparativa não estão sob controle do clínico e podem variar segundo características genéticas e fenotípicas do indivíduo, incluindo a qualidade do tecido ósseo, e devido à influência de doenças e condições sistêmicas, como o diabetes.

O Diabetes mellitus é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante da deficiência na secreção da insulina, resistência à ação do hormônio ou ambos (7). O DM é considerado um fator de risco para a periodontite, com maior progressão da doença periodontal e maior taxa de perda dentária (8). Este fato tem resultado na busca crescente pela reabilitação com implantes dentais. Entretanto, alguns autores relatam maior perda de implantes dentais nesses pacientes (9, 10).

Mecanismos de formação e remodelação óssea podem estar comprometidos em pacientes com diabetes, levando à pobre cicatrização e regeneração após injúria (11); síntese prejudicada de colágeno (12); diminuição na expressão de fatores de transcrição que regulam a diferenciação de osteoblastos (13) e redução do *turnover* ósseo (14).

Por outro lado, vários autores relatam que modificações na superfície do implante podem favorecer a osseointegração, acelerando a formação óssea (15),

aumentando o contato osso/implante (16) e influenciando eventos celulares, como adesão, migração, diferenciação e expressão gênica de células em contato e nas proximidades com o implante (17-19). Dentre os diversos tipos de modificações existentes, a adição de íons fluoreto tem demonstrado resultados promissores, tais como aumento da biocompatibilidade (20), maior formação óssea nos estágios iniciais de cicatrização (21) e maior proliferação de osteoblastos (22, 23).

Sendo assim, modificações na superfície do implante poderiam compensar a deficiência no processo de reparação e neoformação óssea, como verificado no diabetes, e melhorar a taxa de sucesso de implantes para portadores desta desordem metabólica. Porém, não foi encontrado na literatura nenhum estudo que avaliasse a efetividade de uma superfície tratada com fluoretos em animais com diabetes.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se uma superfície tratada com íons fluoreto resultaria em maior osseointegração de implantes instalados em animais com diabetes descompensado.

## **Material e Métodos**

Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Brasil (Proc. CEUA nº 10/2011). Os procedimentos cirúrgicos e laboratoriais foram realizados no Biotério da mesma instituição.

### *Animais*

Um total de 90 ratos Wistar machos, com idade aproximada de 4-6 semanas e peso variando de 150g a 200g, foram mantidos no biotério sob condições de umidade, temperatura e exposição à luz controladas. Os animais foram aleatoriamente divididos

em 3 grupos experimentais (30 animais por grupo), de acordo com a condição sistêmica: grupo controle (“C”, ratos não diabéticos), grupo diabético descompensado (“D”) e grupo diabético controlado com insulina (DC).

#### *Indução do Diabetes mellitus*

Após um período de 16 horas de jejum, exceto água *ad libitum*, os animais do Grupo D e DC foram submetidos à administração, por via intraperitoneal, de 50mg de estreptozotocina (STZ) por kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato pH 4,5 (24).

Os animais do Grupo C receberam, no mesmo período, injeção de solução salina via intraperitoneal (25).

Após 24 horas da indução do DM, foi feita a comprovação do quadro diabético por meio da análise da taxa glicêmica e foram considerados diabéticos os animais com glicemia superior a 300mg/dl (25).

Para garantir que o diabetes induzido mimetizaria a condição sistêmica da doença previamente instalada, foi determinado um intervalo de 30 dias entre a indução do diabetes e a instalação dos implantes. Considerando as características dos animais utilizados no estudo, este período de 30 dias seria comparável a um tempo de 3 anos de diagnóstico do diabetes em humanos (26). Avaliações semanais do nível glicêmico foram realizadas durante todo o estudo para assegurar esta condição.

#### *Administração de Insulina*

Após a confirmação do estado hiperglicêmico, os animais do grupo DC receberam injeções subcutâneas, duas vezes ao dia, de 2.5-3U de insulina (Humulin NPH U-100, Lilly, Fegershein, France) para controle da glicemia durante todo período experimental

(27). Os animais do grupo C e D receberam o mesmo protocolo de tratamento, porém, com solução salina.

### *Instalação dos Implantes*

Os implantes foram instalados um mês após a indução do DM, caracterizando o baseline desse estudo. Os animais foram anestesiados via intramuscular com associação de xylazina (4mg/Kg-Francotar, Virbac do Brasil, São Paulo, Brasil) e quetamina (8mg/kg Vyrbaxil, Virbac do Brasil, São Paulo, Brasil). Após antisepsia da região, foram realizadas incisões de aproximadamente 3 cm de comprimento, bilateralmente, no lado interno da perna, abaixo do joelho. Após delicada dissecação, o osso da metáfise tibial foi exposto. Os implantes foram instalados seguindo o protocolo de inserção indicado pelos fabricantes, com abundante irrigação de solução salina. Cada animal recebeu 2 implantes (4.0mm de comprimento e 2.2mm de diâmetro, Conexão Sistemas de Prótese Ltda., SP, Brazil), um em cada metáfise tibial, sendo um com superfície sem tratamento, maquinada (“M”), e o outro com superfície tratada com fluoreto (“F”). De acordo com o fabricante, esta superfície foi obtida após ataque ácido ( $H_2SO_4 + HCl + HNO_3$ ) da superfície do implante, seguido de sua imersão em solução contendo  $Na^+$  e  $F^-$ . Após instalação, os tecidos foram reposicionados e suturados (Seda 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Cada animal recebeu, no pós-operatório, uma dose de 0.1mg/kg de Pentabiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Forte Dodges Saude Anial, Campinas, Brazil) e 0.1mg/kg de analgésico (Dipirona Ibas 50%, Laboratório Ibas, São Paulo, Brasil), por via intramuscular.

Cada grupo foi então dividido em 3 subgrupos (10 animais cada), de acordo com o período de sacrifício de 2, 4 e 6 semanas após a instalação dos implantes, totalizando 10 animais/grupo/período de avaliação, resultando em 10 amostras (implantes) de cada

superfície por grupo/período de avaliação. O cálculo amostral foi baseado em estudos anteriores utilizando animais diabéticos (28), no qual um total de 7 amostras/grupo/período resultaria em um poder do estudo de 90%.

#### *Procedimentos histométricos*

Após 2, 4 e 6 semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados com uma dose letal da combinação anestésica anteriormente relatada. As tíbias contendo os implantes foram removidas e armazenadas em formalina neutra tamponada a 4%. Após o processo de fixação (48 horas) e posterior lavagem em água corrente, os espécimes foram desidratados em solução de álcool etílico. A infiltração de resina foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) e álcool etílico, em concentrações crescentes de resina, sendo finalmente incluídos em resina e polimerizados. Os blocos foram montados em lâmina acrílica com o auxílio da resina Tecnovit 4000 (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Utilizando um sistema de corte e microdesgaste (Exact-Cutting, System, Apparatebau GmbH, Hamburgo, Alemanha), as lâminas foram processadas até que fossem obtidos cortes de 40 a 50  $\mu\text{m}$  de espessura. As peças foram coradas com stevenel's blue + fucsina ácida para realização da análise histométrica.

#### *Análise histométrica*

As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, por meio do qual as imagens foram capturadas e enviadas para um microcomputador, com auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony electronics Inc, Japão). A determinação dos valores foi feita utilizando um software analisador de imagens (Image Tool para Windows- version3.00, Texas, USA). Os



valores de contato osso/implante (BIC) e de fração de área de tecido ósseo (BAFO) entre as roscas foram obtidos em percentual, pela análise das duas primeiras roscas dos implantes bilateralmente, de acordo com modificação de metodologia previamente publicada por nosso grupo (28).

#### *Análise Estatística*

Os dados relativos ao contato osso/implante (BIC) e fração de área de tecido ósseo (BAFO) entre as roscas dos implantes para cada grupo e período de avaliação foram expressos em médias e desvio-padrão. A análise estatística foi realizada empregando o software GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc., USA). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade e distribuição dos dados, de acordo com o teorema da distribuição central. Devido à distribuição normal, o teste t-não pareado foi utilizado para comparação intra-grupo e Anova, complementado por teste de Tukey, para comparações intergrupos. O nível de significância foi definido em 5% ( $p < 0.05$ ).

#### **Resultados**

##### *Dados sistêmicos*

Os resultados de peso e glicemia foram descritos em estudo anterior (Fontanari et al., 2013). Resumidamente, foi verificado que os animais diabéticos descompensados apresentaram menor peso e maior taxa de glicemia em relação aos grupos controle e diabético controlado, em todos os períodos de avaliação.

##### *Extensão linear do contato osso/implante (BIC)*

A tabela 1 refere-se à análise dos valores de contato osso/implante para superfície maquinada (M) e superfície tratada com fluoretos (F) nos 3 grupos avaliados.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao contato osso/implante, nos diferentes períodos avaliados, tanto para superfície M quanto para superfície F. Na análise intra-grupos foi demonstrado que a modificação de superfície não teve influência significativa sobre os valores de contato osso/implante, nos diferentes grupos e períodos avaliados (tabela 1). Embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os períodos dentro de cada grupo, a tendência de aumento dos valores com o tempo foi evidente.

#### *Fração de área de tecido ósseo entre as roscas (BAFO)*

Os dados da tabela 2 referem-se à média e desvio-padrão dos valores de fração de área de tecido ósseo entre as roscas dos implantes para superfície M e F.

Os resultados demonstraram que, para superfície M, os animais dos grupos controle e diabético controlado apresentaram valores de área de tecido ósseo entre as roscas dos implantes estatisticamente superiores ao grupo diabético descompensado no período de 4 semanas ( $p < 0.05$ ). Em relação à superfície F, foi verificado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para esse parâmetro. Na análise intra-grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre implantes de superfícies M e F quanto à fração de área de tecido ósseo entre as roscas, para todos os grupos avaliados (tabela 2).

As figuras 1 a 6 ilustram os grupos, empregando ambas as superfícies, nos diferentes períodos de sacrifício.

### **Discussão**

Devido a resultados de estudos em humanos, que mostraram alta taxa de perda de implantes em indivíduos com DM (9, 10), e outros em animais, que demonstraram

menor formação óssea ao redor de implantes (28-30), o diabetes passou a ser considerado uma contraindicação relativa para a instalação de implantes.

Os estudos em animais com DM induzido por streptozotocina demonstraram menor contato osso/implante (BIC) quando comparados a animais controle saudáveis (29) (31), assim como menor formação óssea (30). Em contrapartida, o emprego da insulina em ratos diabéticos, resultou em valores de BIC para o grupo diabetes controlado (tratados com insulina) semelhantes ao grupo controle (ratos saudáveis) e maiores do que os verificados para o grupo diabetes não controlado. Entretanto, a área de tecido ósseo entre as roscas foi maior para animais do grupo controle (32). Embora outros estudos tenham mostrado maior volume ósseo ao redor de implantes em ratos diabéticos descompensados em comparação a animais controle e diabéticos compensados, foi constatada menor organização do tecido ósseo avaliado (33, 34).

Estudos clínicos com pacientes diabéticos relatam taxas de sucesso para implantes entre 85,6% a 94,3%, sendo esta menor em comparação a pacientes não diabéticos (9, 10, 35). Embora investigações recentes em pacientes com DM tenham mostrado taxa de sucesso semelhante para grupos saudáveis, diabéticos compensados e diabéticos descompensados (36, 37), a longo prazo pacientes com pobre controle glicêmico podem apresentar redução na estabilidade dos implantes (37).

Estudos demonstram que modificações na superfície do implante podem acelerar (15) a osseointegração e aumentar o contato osso/implante (16). Sendo assim, a hipótese do presente estudo foi que uma superfície tratada com íons fluoreto, poderia melhorar a remodelação óssea e, conseqüentemente, a osseointegração, considerada alterada em portadores de diabetes descompensado.

Em estudo realizado em porcos saudáveis e com diabetes descompensado, os autores observaram que a superfície teste SLActive (jateamento de areia + ataque ácido-HCL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + armazenamento em solução isotônica de NaCl) resultou em maiores valores de BIC em relação à superfície controle SLA (jateamento de areia + ataque ácido-HCL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concluíram que o tratamento de superfície (SLActive) acelerou a formação óssea, compensando a influência negativa do DM na osseointegração (31).

Em outro estudo, as mesmas superfícies (SLA e SLActive) foram testadas em pacientes com DM descompensado. Os autores constataram a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies quanto à estabilidade dos implantes e destacaram a alta taxa de sucesso (98%) para a amostra avaliada (38).

Uma alternativa para melhorar a osseointegração consiste na incorporação de fluoretos na camada de óxido de titânio da superfície do implante. Estudos mostram que esse tipo de tratamento resulta em uma superfície mais biocompatível (20), que estimula a proliferação de osteoblastos (22) e aumenta a formação óssea ao redor dos implantes nos estágios iniciais de cicatrização (21). Até o momento este é o primeiro estudo avaliando a efetividade deste tipo de superfície sobre a osseointegração de implantes em animais com DM.

Nossos resultados demonstram a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao parâmetro contato osso/implante para superfície maquinada. Apesar disso, o grupo D apresentou tendência a valores menores quando comparado ao grupo C (4 e 6 semanas) e ao grupo DC (2 e 6 semanas). Esta tendência também foi observada na análise da fração de área de tecido ósseo entre as roscas para implantes de superfície maquinada, onde podemos observar que o grupo D apresentou menores valores em todos os períodos de avaliação em comparação aos grupos C e DC,

sendo estas diferenças estatisticamente significantes no período de 4 semanas. Estes resultados corroboram os de Molon et al. (2012) (28) em estudo que avaliou a instalação de implantes em ratos com diabetes induzido. Entretanto, deve-se esclarecer que os protocolos dos estudos são diferentes. Enquanto o estudo citado instalou os implantes e induziu o diabetes após dois meses, com sacrifício dos animais após quatro meses do baseline, no presente estudo o objetivo foi avaliar a capacidade de osseointegração de implantes com diferentes superfícies em animais com diabetes induzido anteriormente à instalação dos implantes. Dessa forma, no estudo de Molon et al (2012) (28), o tempo maior para formação óssea (4 meses) pode ter influenciado na obtenção de valores significativamente maiores de fração de área de tecido ósseo para animais saudáveis e tratados com insulina em relação aos diabéticos. Nossos resultados de torque de remoção (Fontanari et al., 2013) demonstram que, para implantes com superfície M, o grupo D apresentou menores valores em relação aos grupos C e DC, sendo estas diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 4 e 6 semanas, reforçando nossos achados histométricos.

Na análise dos resultados de contato osso/implante para superfície F, foi constatado que o grupo D apresentou tendência a piores resultados em comparação ao grupo C nos períodos de 2 e 4 semanas e em relação ao grupo DC em 2, 4 e 6 semanas. Esses resultados mostram novamente a tendência de menor contato osso/implante no grupo D, independente do tratamento de superfície, podendo ser resultado do severo estado hiperglicêmico mantido durante todo o experimento.

A mesma tendência pode ser observada para superfície F, quando a fração de área de tecido ósseo foi analisada. Neste caso, o grupo D apresentou piores resultados em relação ao grupo C em 4 e 6 semanas e ao grupo DC em 6 semanas, porém, sem diferenças estatisticamente significantes. Confirmando isso, em nossos resultados de

torque de remoção o grupo D apresentou em todos os períodos de avaliação valores significativamente menores em relação as grupos C e DC, mesmo para superfície F.

Tanto para contato osso/implante como para fração de área de tecido ósseo entre roscas, os piores resultados foram relacionados ao grupo D. Embora os mecanismos não sejam totalmente esclarecidos, sabe-se que o diabetes interfere com a formação óssea devido, dentre outros efeitos, a uma expressão inadequada de fatores de transcrição importantes para a diferenciação dos osteoblastos, tais como *Cbfa1/Runx-2* (11, 13). Além disso, a hiperglicemia crônica aumenta a formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), sendo que os osteoblastos expressam receptores para tais produtos (RAGEs), os quais reconhecidamente reduzem o potencial osteogênico (39, 40). No presente estudo, a descompensação metabólica estabelecida pela indução do diabetes ao longo de 30 dias antes da colocação dos implantes e confirmada pelo alto nível de glicemia nos animais do grupo D, pode ter levado ao acúmulo de AGEs, interferindo negativamente no processo de reparação óssea e na osseointegração.

Os valores de contato osso/implante e área de tecido ósseo para grupos C e DC não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, independente da superfície avaliada, o que pode ser explicado em parte pelo regime diário de aplicação de insulina, que conduziu a um efetivo controle da glicemia no grupo DC. A insulina estimula diretamente a produção da matriz extracelular e osteoblástica e regula a produção do fator de crescimento derivado da insulina (IGF-1) (41). Este por sua vez, promove a formação de osso por meio da regulação da proliferação e diferenciação osteoblástica (41, 42). Portanto, a diminuição na produção de insulina pode prejudicar, direta e indiretamente, a capacidade de osseointegração no sítio do hospedeiro (43).

Em relação à análise intra-grupos para contato osso/implante, a superfície F não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à superfície M para nenhum dos 3 grupos avaliados. Sendo assim, este parâmetro não foi alterado significativamente pela mudança na superfície do implante. Apesar disso, houve uma tendência a maior contato osso/implante para superfície F no grupo C em 2 e 4 semanas; grupo DC em 2, 4 e 6 semanas; grupo D em 2 semanas. Já em relação à análise intra-grupo para fração de área de tecido ósseo entre as roscas, foram constatados menores valores para superfície F nos grupos C e DC, em todos os períodos avaliados, embora sem diferença estatisticamente significativa. Já para grupo D foram verificados maiores valores para superfície F em relação à M, em todos os períodos, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Os resultados de BAFO no grupo D demonstraram que o implante de superfície F apresentou uma tendência de maiores valores em comparação aos implantes de superfície M, porém esse tipo de benefício não foi encontrado nos animais do grupo C e DC. Dessa forma pode-se levantar a hipótese que a modificação da superfície com fluoretos pode influenciar na neoformação óssea em animais com comprometida capacidade de remodelação óssea, neste caso representado por animais diabéticos descompensados, melhorando esse processo.

Os resultados de estudo prévio realizado por este grupo (Fontanari et al., 2013) demonstrou maior força de torque de remoção para implantes com superfície F em comparação a implantes de superfície M, a despeito do percentual semelhante de BIC e BAFO entre os grupos. Uma hipótese para explicar esses resultados seria a maior força de ligação química do fluoreto com o cálcio e o fósforo em comparação à ligação do titânio com o cálcio e o fósforo. Isto provavelmente se deve ao fato que o flúor é o elemento mais eletronegativo da tabela periódica e, dessa forma, apresenta tendência de

formar ligações iônicas com maior força de ligação. Entretanto, estudos moleculares são necessários para confirmar essa suposição.

Estudos (44, 45) sugerem que as superfícies de titânio modificadas por fluoretos apresentam modificação na estrutura química da superfície, resultando em aumento da afinidade do TiO<sub>2</sub> aos íons cálcio e fosfato. Por outro lado, outro estudo (46) relatou que o fluoreto da superfície age como um sítio para a precipitação do cálcio e fosfato, aumentando a estabilidade dos implantes avaliados por torque de remoção. Já Ellingsen et al (2004) (45), em estudo in vivo, demonstraram retenção significativamente maior para implantes com superfície tratada com fluoretos em comparação a implantes com superfície rugosa, após 3 meses de cicatrização.

Entende-se que outros estudos devem ser desenvolvidos buscando modificações de superfície que efetivamente melhorem a capacidade de neoformação e remodelação óssea nos casos em que essas funções estão comprometidas sistemicamente.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos e com a metodologia aplicada, pode-se concluir que o DM resultou em menor taxa de BIC e BAFO, porém com reversão do efeito negativo pelo emprego da insulina. Adicionalmente foi verificado que a superfície tratada com fluoretos foi capaz de reverter de forma sutil o efeito negativo do diabetes descompensado sobre o percentual de preenchimento ósseo entre as roscas.

## **Referências**

1. Schwartz-Arad D, Kidron N, Dolev E. A long-term study of implants supporting overdentures as a model for implant success. J Periodontol 2005;76:1431-1435.



2. Blanes RJ, Bernard JP, Blanes ZM, Belser UC. A 10-year prospective study of ITI dental implants placed in the posterior region. I: Clinical and radiographic results. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:699-706.
3. Ferrigno N, Laureti M, Fanali S, Grippaudo G. A long-term follow-up study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten-year life table analysis of a prospective multicenter study with 1286 implants. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:260-273.
4. Priest G. Single-tooth implants and their role in preserving remaining teeth: a 10-year survival study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:181-188.
5. Branemark 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.
6. 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.
7. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35 Suppl 1:S64-71.
8. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
9. Fiorellini JP, Chen PK, Nevins M, Nevins ML. A retrospective study of dental implants in diabetic patients. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2000;20:366-373.
10. Morris HF, Ochi S, Winkler S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2000;5:157-165.

11. Fowlkes JL, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN, Cockrell GE, et al. Runx-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* 2008;149:1697-1704.
12. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1981;30:670-677.
13. 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;144:346-352.
14. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol* 2000 2000;23:73-77.
15. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:391-401.
16. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:11-19.
17. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-413.
18. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:105-111.
19. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:333-344.

20. Huang HH. Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials* 2003;24:275-282.
21. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000;84:522-534.
22. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. The effects of fluoride on osteoblast progenitors in vitro. *J Bone Miner Res* 1990;5 Suppl 1:S101-105.
23. Wergedal JE, Lau KH, Baylink DJ. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. *Clin Orthop Relat Res* 1988:274-282.
24. Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2002;81:191-197.
25. 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:E340-347.
26. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005;21:775-777.
27. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E, Jr., Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:796-801.
28. de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res* 2012.

29. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-629.
30. Takeshita F, Murai K, Iyama S, Ayukawa Y, Suetsugu T. Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibiae. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol* 1998;69:314-320.
31. Schlegel KA, Prechtl C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmowsky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res* 2011.
32. 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;10:362-368.
33. 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;15:345-354.
34. 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.
35. Courtney MW, Jr., Snider TN, Cottrell DA. Dental implant placement in type II diabetics: a review of the literature. *J Mass Dent Soc* 2010;59:12-14.
36. Dowell S, Oates TW, Robinson M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study. *J Am Dent Assoc* 2007;138:355-361; quiz 397-358.
37. Oates TW, Dowell S, Robinson M, McMahan CA. Glycemic control and implant stabilization in type 2 diabetes mellitus. *J Dent Res* 2009;88:367-371.

38. Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C. Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 Diabetes mellitus - a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res* 2011.
39. Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD. Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol Cell Biochem* 2003;250:1-10.
40. 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;52:1502-1510.
41. Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980;66:709-719.
42. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:621-631.
43. Hasegawa H, Ozawa S, Hashimoto K, Takeichi T, Ogawa T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:237-246.
44. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:203-211.
45. 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;19:659-666.

46. Ellingsen J. Pretreatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:749-753.

**Tabela 1** - Média e desvio-padrão dos valores de contato osso/implante

	<i>2 semanas</i>		<i>4 semanas</i>		<i>6 semanas</i>	
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>
<i>C</i>	27.40±16.65	34.79±26.78	42.96±13.27	44.04±12.75	55.68±22.27	44.68±12.77
<i>CD</i>	35.73±15.49	41.54±24.06	33.46±13.06	45.71±23.36	50.71±22.60	60.61±14.74
<i>D</i>	32.89±17.86	33.04±9.06	36.11±17.82	34.48±10.37	49.55±14.80	48.66±20.04

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos/superfícies (Teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey;  $p < 0.05$ ).

**Tabela 2** - Média e desvio-padrão dos valores de fração de área de tecido ósseo entre as roscas dos implantes

	<i>2 semanas</i>		<i>4 semanas</i>		<i>6 semanas</i>	
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>
<i>C</i>	36.45±15.16	25.98±9.65	41.22±22.84*	29.03±10.51	52.92±16.55	48.06±20.80
<i>CD</i>	38.05±24.58	31.59±11.88	55.04±12.26*	22.49±11.84	56.23±21.30	47.45±14.61
<i>D</i>	22.56±21.24	44.12±17.48	23.62±9.76	25.45±20.20	23.60±9.80	41.08±24.16

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo diabético descompensado (Teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey;  $p < 0.05$ ).

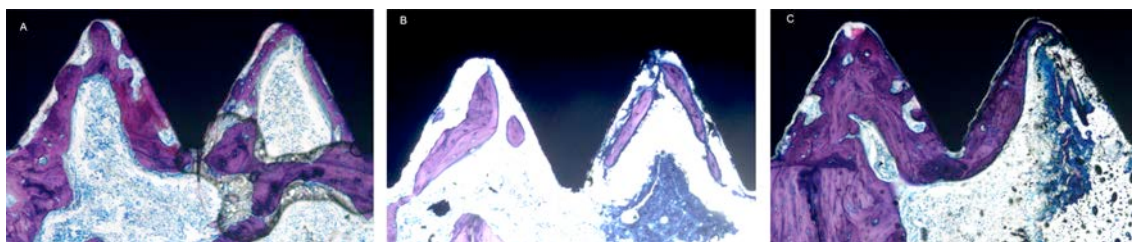


Figura 1- Grupo Controle-Superfície Maquinada. A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas)

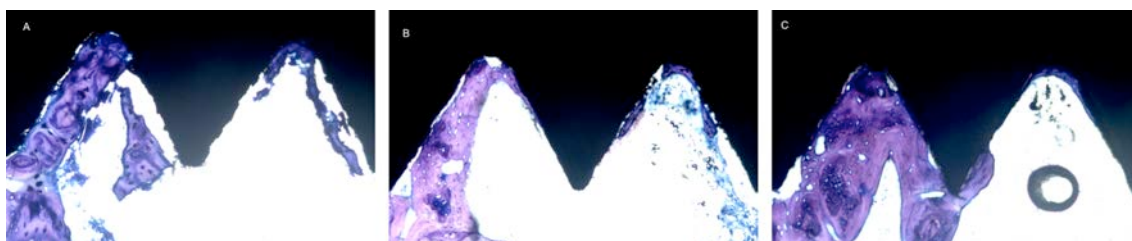


Figura 2-Grupo Controle-Superfície tratada com Fluoretos. A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas)

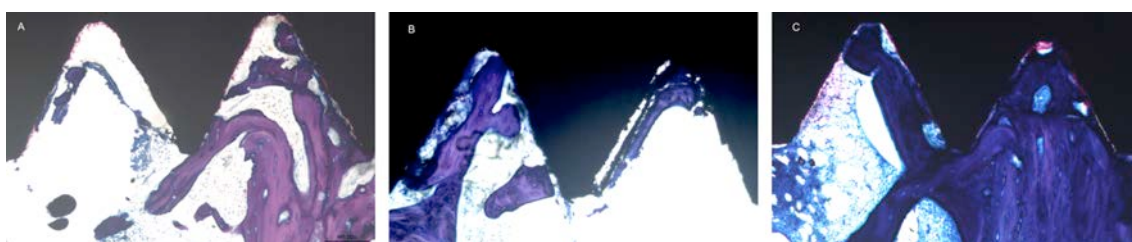


Figura 3-Grupo Diabético Controlado-Superfície Maquinada.

A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas).

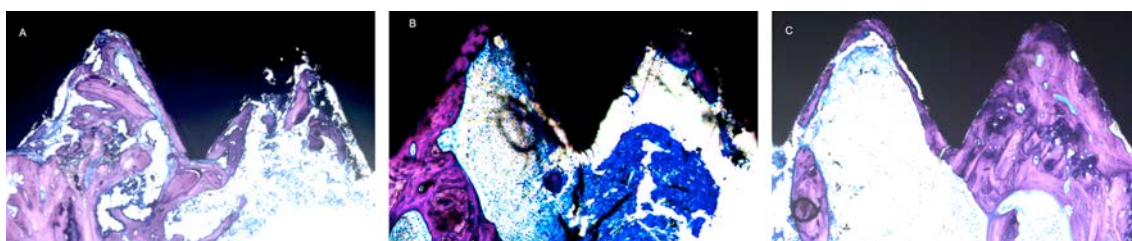


Figura 4-Grupo Diabético Controlado- Superfície tratada com Fluoretos.

A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas)



Figura 5- Grupo Diabético Descompensado-Superfície Maquinada.

A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas)

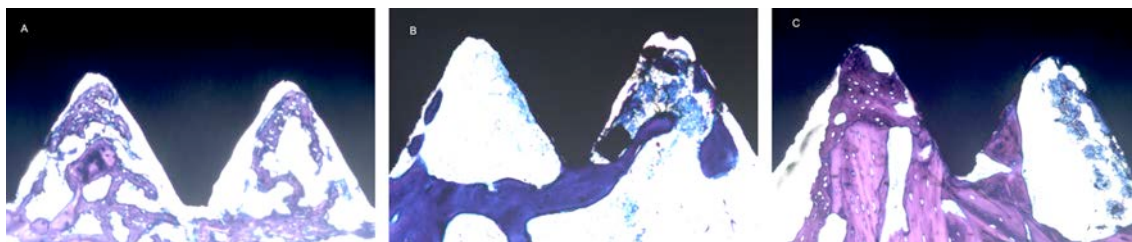
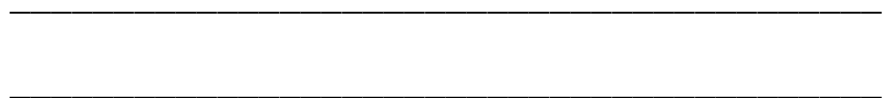


Figura 6- Grupo Diabético Descompensado- Superfície tratada com Fluoretos. A(2 semanas); B (4 semanas); C (6 semanas)



## **6 DISCUSSÃO**



## **6 DISCUSSÃO**

Segundo Albrektson et al.<sup>5</sup> (1981) alguns fatores relacionados ao implante podem ser controlados para se alcançar a osseointegração, como biocompatibilidade do material, técnica cirúrgica utilizada para instalação, desenho, condições das cargas aplicadas após sua instalação e qualidade da superfície utilizada. No entanto, os fatores relacionados à capacidade de reparo não estão sob o controle do clínico e podem variar segundo características genéticas e fenotípicas de cada indivíduo, incluindo a qualidade do tecido ósseo e influências de doenças e condições sistêmicas, como o diabetes.

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças caracterizadas pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina pelo pâncreas, em sua ação ou em ambos<sup>2</sup>. O DM é um dos mais importantes problemas mundiais de saúde na atualidade, tanto em termos de número de pessoas afetadas, incapacitação, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações. A prevalência do DM na população adulta mundial é de cerca de 6,4%, e há uma tendência ao aumento desta nos países desenvolvidos com uma previsão de 7,7% para 2030, devido à longevidade progressiva das populações e às modificações socioculturais decorrentes do desenvolvimento urbano<sup>61</sup>.

O DM é considerado um fator de risco para periodontite, e pacientes com essa doença apresentam maior taxa de perda dentária<sup>45</sup>, necessitando cada vez mais de reabilitação com implantes dentais. Porém, os mecanismos de formação e remodelação óssea são alterados em pacientes diabéticos, incluindo aqueles responsáveis pela osseointegração de implantes dentais como inibição da formação de matriz colágena e redução do turnover ósseo<sup>28, 29, 41</sup>.

Apesar de controversa, a literatura mostra que o DM, quando não controlado, afeta negativamente a osseointegração de implantes em estudos em animais <sup>17, 36</sup> e em humanos <sup>46</sup>. Pacientes diabéticos com bom controle metabólico podem ser tratados como saudáveis, e apresentam alto índice de sucesso com implantes dentários <sup>36, 39, 46</sup>. Porém, em muitos casos um constante e rígido controle glicêmico é difícil de ser alcançado, e alterações nos níveis de glicose durante, ou após o período de osseointegração dos implantes poderá levar a falhas <sup>49</sup>.

Por outro lado, alterações na superfície do implante podem favorecer a osseointegração, acelerando a formação óssea <sup>16</sup>, aumentando o contato osso-implante <sup>68</sup> e influenciando eventos celulares, como adesão, migração, diferenciação e expressão gênica de células em contato com o implante e nas suas proximidades <sup>19, 34, 59</sup>. Entre as diversas técnicas utilizadas para tal, a adição de íons fluoreto apresenta resultados promissores como o aumento da biocompatibilidade <sup>33</sup>, maior formação óssea nos estágios iniciais de cicatrização <sup>14</sup> e maior proliferação de osteoblastos <sup>10, 69</sup> e elevação na atividade da fosfatase alcalina <sup>26</sup>.

Sendo assim, é plausível a hipótese que modificações na superfície do implante poderiam compensar a deficiência em osso comprometido, como no DM, e melhorar as taxas de sucesso de implantes para indivíduos portadores desta desordem metabólica.

Testando esta hipótese, um estudo foi realizado em porcos diabéticos descontrolados e saudáveis. Os autores observaram que a superfície teste SLActive (jateamento de areia + ataque ácido-HCL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + armazenamento em solução isotônica de NaCl) obteve melhores resultados de BIC que a superfície controle SLA (jateamento de areia + ataque ácido-HCL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concluíram que o tratamento de superfície acelerou a formação óssea mesmo na presença do DM e compensou a influência negativa do DM na osseointegração <sup>58</sup>. Em outro estudo, as mesmas superfícies foram

testadas em pacientes com DM descontrolado. Apesar de não ter sido encontrada diferenças estatisticamente significantes em relação a estabilidade dos implantes para as duas superfícies, os autores destacaram a alta taxa de sucesso, 98%, mesmo em pacientes com DM descontrolado<sup>37</sup>.

No presente estudo (Apêndice), para testar a mesma hipótese, foi utilizada uma superfície tratada com fluoretos, que de acordo com o fabricante, foi obtida após ataque ácido ( $H_2SO_4 + HCl + HNO_3$ ) seguida da imersão do implante em solução contendo  $Na^+$  e  $F^-$ . Até o momento não encontramos na literatura nenhum estudo que comparasse a efetividade deste tipo de superfície em modelos experimentais com desordem metabólica como o DM.

Em nossos achados, em relação ao peso dos animais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no dia da comprovação do estado diabético, o que demonstrou que a randomização dos animais entre os grupos foi eficiente na padronização dos pesos dos animais entre os grupos. Os animais do grupo C e DC apresentaram maior peso que os animais D no baseline ( $p < 0.05$ ). Os animais do grupo C apresentaram maior peso corporal que os animais dos grupos DC e D no período de 2 semanas de avaliação ( $p < 0.001$ ), e que os animais do grupo D nos períodos de 4 e 6 semanas ( $p < 0.001$ ). Os animais do grupo DC apresentaram maior peso corporal que os animais do grupo D nos períodos de 2, 4 e 6 semanas ( $p < 0.001$ ). Estes resultados estão de acordo com outros estudos<sup>18, 65</sup>, e mostraram um dos sinais clássicos do DM tipo 1 não tratado que é a rápida perda de peso. Outros sinais clássicos puderam ser observados no grupo D tais como, polidipsia, polifagia e poliúria, o que demonstrou diariamente a presença e a severidade da doença nestes animais.

Em relação aos níveis glicêmicos, no dia da certificação do estado diabético, os animais dos grupos D e DC mostraram valores estatisticamente maiores que os animais

do grupo C ( $p < 0.0001$ ), comprovando a efetividade do modelo de indução do DM utilizado em nosso estudo. No baseline e nos períodos de avaliação de 2, 4 e 6 semanas, os níveis glicêmicos dos animais do grupo D foram sempre maiores significativamente ( $p < 0.0001$ ) que os grupos C e DC, os quais foram sempre similares entre si, comprovando a eficácia do regime de aplicação diária de insulina no grupo DC, em nosso estudo.

Nossos resultados de torque de remoção (RTV), para implantes de superfície maquinada (M) mostraram que, o grupo D apresentou valores menores ( $p < 0.05$ ) que o grupo C, mas similares ao grupo DC em 4 e 6 semanas após a colocação dos implantes, sugerindo que o DM pode afetar a remodelação óssea mesmo em animais controlados. Quando implantes de superfícies tratadas com fluoretos foram utilizados (F), o grupo D também apresentou menores valores que os outros 2 grupos, os quais foram estatisticamente similares em 2 e 6 semanas. Em nosso estudo, quando analisado o BIC em superfícies maquinadas, apesar de não ter sido encontrada diferenças estatisticamente significantes o grupo D apresentou tendência a valores mais baixos que o grupo C em 4 e 6 semanas e que o grupo DC em 2 e 6 semanas. Esta tendência também foi observada na análise da fração de área de tecido ósseo entre as roscas das superfícies maquinadas, onde podemos observar que o grupo D apresentou menores valores em todos os períodos de avaliação que os grupos C e DC, sendo estas diferenças estatisticamente significantes em 4 semanas ( $p < 0.05$ ). Quando o BIC de superfícies F foram analisadas, o grupo D apresentou tendência a piores resultados que o grupo C em 2 e 4 semanas e que o grupo DC em 2, 4 e 6 semanas. Por sua vez, a mesma tendência foi encontrada quando analisada a área de preenchimento ósseo para as superfícies F. Neste caso, o grupo D apresentou piores resultados que o grupo C em 4 e 6 semanas e que o grupo DC em 6 semanas, porém sem diferenças estatisticamente significantes.

Mesmo que muitas vezes de forma não estatisticamente significativa, os piores resultados foram relacionados ao grupo D. Embora as vias sejam desconhecidas, o DM experimental interfere na formação óssea por não fornecerem uma expressão adequada de fatores de transcrição importantes para a diferenciação de osteoblastos, tais como Cbfa1/Runx-2<sup>41</sup>. Além disso, a hiperglicemia crônica resulta na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)<sup>15,57</sup>. Os osteoblastos expressam receptores para os AGEs (RAGEs), que são conhecidos por reduzirem o potencial osteogênico destas células<sup>15,57</sup>. Portanto, no presente estudo, o acúmulo de AGEs ao longo de 1 mês antes da colocação dos implantes e após 2, 4 e 6 semanas do procedimento cirúrgico poderia explicar os piores valores obtidos para o grupo D independente da superfície utilizada.

Em geral, independente do tipo de análise e de superfície utilizada, o grupo DC obteve valores próximos ao grupo C. A insulina estimula diretamente a produção da matriz extracelular e osteoblástica e regula a produção do fator de crescimento derivado da insulina (IGF-1)<sup>12</sup>. Este por seu vez promove a formação de osso por meio da regulação da proliferação e diferenciação osteoblástica<sup>12,38</sup>. Portanto, a diminuição na produção de insulina pode prejudicar direta e indiretamente a capacidade de osseointegração no sítio do hospedeiro<sup>31</sup>. Os resultados de nosso estudo para o grupo DC corroboram outros achados<sup>18,65</sup> e sugerem que o rígido e diário regime de aplicação de insulina tenha sido responsável por estes resultados.

Em relação à análise intra-grupos do contato osso-implante a superfície F não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação a superfície M para nenhum dos 3 grupos avaliados. Sendo assim, este parâmetro não foi alterado significativamente pela mudança na superfície do implante. Apesar disso, houve uma tendência a maior contato osso-implante em superfícies F no grupo C em 2 e 4 semanas; no grupo DC em 2, 4 e 6 semanas; grupo D em 2 semanas. Por outro lado, na avaliação

da fração de tecido ósseo entre as roscas (BAFO) a superfície M apresentou tendência a maiores valores no grupo C e DC em 2, 4 e 6 semanas, embora sem diferença estatisticamente significativa. A exceção foi no grupo D que apresentou tendência a maiores valores de BAFO nos três períodos avaliados para a superfície F, apesar de não significativa estatisticamente.

Os resultados de BAFO no grupo D demonstraram que o implante de superfície F apresentou uma tendência de maiores valores em comparação aos implantes de superfície M, porém esse tipo de benefício não foi encontrado nos animais do grupo C e DC. Dessa forma pode-se levantar a hipótese que a modificação da superfície com íons fluoreto pode influenciar na neoformação óssea em animais com comprometida capacidade de remodelação óssea, neste caso representado por animais com DM descompensado, melhorando este processo.

Em nossos resultados intra-grupos para o torque de remoção os implantes de superfície F apresentaram maiores valores, estatisticamente significantes, para todos os grupos em todos os períodos avaliados em relação a superfície M, a despeito da porcentagem semelhante de BIC e BAFO encontrada entre as superfícies nos diferentes grupos e períodos. Uma hipótese para explicar esses resultados seria a maior força de ligação química entre o fluoreto (F<sup>-</sup>) com o cálcio e o fosfato que entre o titânio e o cálcio e o fosfato, devido ao fato do flúor ser o elemento mais eletronegativo da tabela periódica e dessa forma apresentar tendência de formar ligações iônicas que possuem maior força de ligação, porém serão necessários estudos moleculares para confirmar essa suposição.

Estudos sugerem que as superfícies de titânio modificadas por íons fluoreto apresentam modificação na estrutura química da superfície, resultando em aumento da

afinidade do  $\text{TiO}_2$  aos íons cálcio e fosfato <sup>25,35</sup>. A formação de hidroxiapatita fluoretada e fluorapatita em tecidos calcificados tem sido documentada <sup>9</sup>. Um aumento na taxa de deposição de cristais de apatita também foi observado <sup>6,26</sup>. Outro estudo <sup>24</sup> relata que o fluoreto da superfície age como um sítio para a precipitação do cálcio e fosfato, aumentando a estabilidade dos implantes. Já Ellingsen et al <sup>25</sup> (2004), em estudo in vivo (tíbia de coelhos), demonstraram retenção significativamente maior para implantes com superfície tratada com íons fluoreto em comparação a implantes com superfície rugosa, após 3 meses de cicatrização. Neste mesmo estudo <sup>25</sup>, todos os fatores supracitados foram aceitos como possíveis explicações para os maiores valores de BIC e torque de superfícies tratadas com fluoreto em relação a superfícies rugosas. Em nosso estudo, porém, apenas os resultados de torque mostraram superioridade da superfície tratada com fluoretos.

Outros estudos devem ser desenvolvidos buscando modificações de superfície dos implantes que efetivamente melhorem a capacidade de neoformação e remodelação óssea nos casos em que essas funções estejam comprometidas sistemicamente.



## **7 CONCLUSÃO**

---

---

## **7 CONCLUSÃO**

De acordo com a metodologia aplicada e com os resultados obtidos em nossos estudos, pode-se concluir que:

- 1- O DM afeta negativamente a osseointegração;
- 2- A insulino terapia é capaz de favorecer a osseointegração em ratos diabéticos;
- 3- A superfície tratada com íons fluoreto favoreceu a retenção mecânica dos implantes;
- 4- A superfície tratada com íons fluoreto foi capaz de reverter de forma sutil o efeito negativo do DM sobre o percentual de preenchimento ósseo entre as roscas;

## REFERÊNCIAS

---

---

**REFERÊNCIAS\***

1. Diabetes and periodontal diseases. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. *J Periodontol*. 2000; 71(4): 664-78.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012; 35 Suppl 1: S64-71.
3. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. *Implant Dent*. 2002; 11(1): 83-6.
4. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark 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(4): 347-59.
5. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52(2): 155-70.
6. Anderson PA, Copenhaver JC, Tencer AF, Clark JM. Response of cortical bone to local controlled release of sodium fluoride: the effect of implant insertion site. *J Orthop Res*. 1991; 9(6): 890-901.
7. 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(3): 467-71.
8. Balshi TJ, Wolfinger GJ. Dental implants in the diabetic patient: a retrospective study. *Implant Dent*. 1999; 8(4): 355-9.
9. Baud CA, Bang S, Very JM. Minor elements in bone mineral and their effects on its solubility. *J Biol Buccale*. 1977; 5(3): 195-202.
10. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. The effects of fluoride on osteoblast progenitors in vitro. *J Bone Miner Res*. 1990; 5 Suppl: 101-5.
11. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2): 81-100.

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

12. Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980; 66(4): 709-19.
13. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc.* 1982; 104(5): 653-60.
14. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 2000; 84(5): 522-34.
15. Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD. Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol Cell Biochem.* 2003; 250(1-2): 1-10.
16. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998; 11(5): 391-401.
17. de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(7): 831-7
18. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E, Jr., Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(8): 796-801.
19. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004; 25(3): 403-13.
20. Dowell S, Oates TW, Robinson M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138(3): 355-61; quiz 397-98.
21. Duarte PM, Cesar Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dent.* 2003; 12(4): 340-6.

22. Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum AW, Filho GR, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*. 2005; 76(1): 107-14.
23. el Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part II. *Implant Dent*. 1999; 8(3): 265-77.
24. Ellingsen J. Pretreatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med*. 1995; 67(3): 749-53.
25. 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(5): 659-66.
26. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science*. 1983; 222(4621): 330-2.
27. Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent*. 2002; 11(3): 262-7.
28. Fiorellini JP, Nevins ML. Dental implant considerations in the diabetic patient. *Periodontol 2000*. 2000; 2(3): 373-7.
29. Fowlkes JL, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN, Cockrell GE, et al. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology*. 2008; 149(4): 1697-704.
30. Hanawa T, Ota M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. *Biomaterials*. 1991; 12(8): 767-74.
31. Hasegawa H, Ozawa S, Hashimoto K, Takeichi T, Ogawa T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(2): 237-46.
32. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res*. 2004; 39(3): 188-93.
33. Huang HH. Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials*. 2003; 24(2): 275-82.

34. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(1): 105-11.
35. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21(2): 203-11.
36. Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. *J Periodontol.* 2009; 80(11): 1719-30.
37. Khandelwal N, Oates TW, Vargas A, Alexander PP, Schoolfield JD, Alex McMahan C. Conventional SLA and chemically modified SLA implants in patients with poorly controlled type 2 Diabetes mellitus - a randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(1): 13-9.
38. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2005; 14(6): 621-31.
39. 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(5): 587-99.
40. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol 2000.* 2000; 2(3): 50-62.
41. 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(1): 346-52.
42. 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(4): 333-9.
43. 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(3): 345-54.

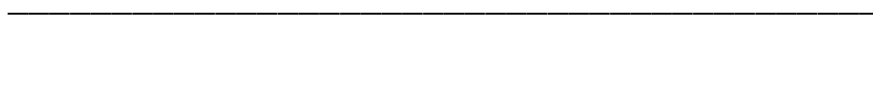
44. McCracken MS, Aponte-Wesson R, Chavali R, Lemons JE. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17(5): 495-500.
45. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
46. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 Suppl2: 97-103.
47. Mori DM, Baviera AM, de Oliveira Ramalho LT, Vendramini RC, Brunetti IL, Pepato MT. Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003; 38(Pt 2): 183-91.
48. 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(5): 620-9.
49. Oates TW, Dowell S, Robinson M, McMahan CA. Glycemic control and implant stabilization in type 2 diabetes mellitus. *J Dent Res.* 2009; 88(4): 367-71.
50. 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(2): 116-22.
51. 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(3): 389-95.
52. Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81(2): 191-7.
53. 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.
54. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials.* 1999; 20(23-24): 2311-21.
55. Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(6): 567-76.
56. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti FH, Jr., Alba RC, Jr., Marcantonio E, Jr. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around



- titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol.* 2003; 74(7): 976-81.
57. 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(6): 1502-10.
  58. Schlegel KA, Prechtl C, Most T, Seidl C, Lutz R, von Wilmsowsky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(2): 128-34
  59. Schwartz Fo HO, Novaes AB, Jr., de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(3): 333-44.
  60. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 1994; 56(3): 340-7.
  61. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(1): 4-14.
  62. 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(3): 242-51.
  63. Smith RA, Berger R, Dodson TB. Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7(3): 367-72.
  64. Spanheimer RG. Direct inhibition of collagen production in vitro by diabetic rat serum. *Metabolism.* 1988; 37(5): 479-85.
  65. Villarino ME, Lewicki M, Ubios AM. Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011; 139(4 Suppl): 76-82.
  66. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications. *Clin Chem.* 1986; 32(10 Suppl): B37-41.
  67. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes.* 1981; 30(8): 670-7.
  68. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(1): 11-9.

69. Wergedal JE, Lau KH, Baylink DJ. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Aug; (233): 274-82.
70. Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials.* 1997; 18(17): 1185-90.

## APÊNDICE



## Material e Métodos

### Amostra

Foram utilizados neste estudo 180 ratos Wistar machos com peso corporal médio de 150g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, 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. Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram previamente encaminhados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (Proc. CEUA n° 10/2011-Anexo) da FOAr-UNESP .

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos de 60 animais cada, sendo um grupo controle (C), composto por ratos saudáveis; um grupo composto por animais com indução do diabetes (Grupo D); e um grupo com animais com diabetes induzido, controlados com insulina (DC). Após 1 mês da indução do diabetes, todos os animais foram submetidos à instalação de 2 implantes com superfícies diferentes (maquinada e superfície tratada com fluoretos), nas metáfises tibiais proximais, direita e esquerda. Nos períodos de 2, 4 e 6 semanas após instalação dos implantes, 20 animais de cada grupo foram sacrificados. Sendo assim, foram obtidos espécimes relativos a 10 animais/ grupo/ superfície/ período/análise. O período de 2 semanas foi escolhido para avaliar o processo inicial de reparação e formação óssea, enquanto o de 4 semanas foi selecionado como um período semelhante ao tempo necessário para a osseointegração em humanos, para osso cortical, e 6 semanas para avaliar o período tardio de osseointegração.

Tal número de amostra foi obtido com base em cálculo amostral específico para testar a hipótese de uma média, feito a partir do site do Laboratório de Epidemiologia e Estatística <sup>66</sup> da USP, que, em teoria, permite a comparação entre os resultados que serão

obtidos em nosso estudo e valores já existentes na literatura, obtidos com metodologias semelhantes <sup>17</sup>. Os dados utilizados como base para o cálculo foram extraídos de um estudo com metodologia semelhante. Nesse cálculo, um n de 7 amostras / grupo / período / superfície seria suficiente para um poder de estudo de 90%. Sendo assim, acrescentamos três amostra a cada grupo para garantir um poder adequado aos resultados, devido a morte dos animais pela debilitação do estado hiperglicêmico.

#### Indução do Diabetes mellitus

Após um período de 16 horas de jejum, exceto água *ad libitum*, nos animais do Grupo D e DC foi administrada por via intraperitoneal 50mg de estreptozotocina (STZ) por kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato pH 4,5 <sup>47, 52</sup>. A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga.

Os animais do Grupo C receberam o mesmo protocolo de tratamento, porém com a administração apenas de soro fisiológico no lugar da estreptozotocina.

#### Controle Glicêmico

Após 24 horas da indução do DM, foi feita a comprovação do quadro diabético por meio da análise da taxa glicêmica <sup>53</sup>.

A coleta de sangue para a determinação da glicemia foi realizada por meio de corte a cerca de 2mm da extremidade distal na cauda de cada animal, o qual permaneceu em uma caixa aquecida durante 2 minutos para a vasodilatação. As amostras de sangue foram coletadas em tubos Eppendorf, contendo liquemine (Roche, São Paulo, Brasil). Após centrifugação do sangue (2500 rpm por 10 minutos) 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. A taxa glicêmica foi avaliada semanalmente durante todo o experimento. Para critérios de inclusão, foram aceitos animais com glicemia inicialmente superior a 300mg/dl<sup>51,53</sup>.

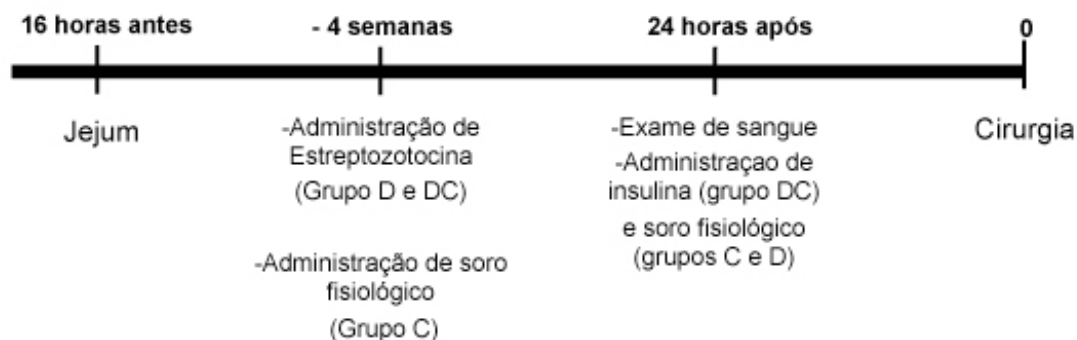
### Administração de Insulina

#### Grupo DC

Neste grupo os animais diabéticos foram tratados duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas) com 2,5 U a 3 U de Insulina NPH (Humulin NPH U-100 – Lilly) logo após a confirmação do estado hiperglicêmico, o que continuou ocorrendo durante todo período experimental. A insulina foi administrada por via subcutânea, em volumes de 0,3mL<sup>18</sup>.

#### Grupo C e D

Os Grupos C e D receberam injeções diárias de cloreto de sódio a 0,9% em volume, intervalo de tempo e via de administração iguais aos da insulina aplicada no Grupo DC, durante todo o período experimental<sup>18</sup>. O esquema abaixo mostra os períodos de indução do diabetes e de administração de insulina e soro fisiológico nos animais dos grupos C, D e DC.



### Procedimentos cirúrgicos

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com uma associação de Quetamina (0,08mL/100g-Cetamin®- Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e Cloridrato de Xilazina (0,04mL/100g-Xilazin® Syntec do Brasil Ltda, Brasil), por via intramuscular.

#### 1- Instalação dos Implantes (Baseline)

Em seguida, foi realizada a tricotomia da região interna da perna logo abaixo do joelho e a antisepsia da região a ser incisada com solução de álcool iodado a 70%. Com uma lâmina número 15 (FEATHER INDUSTRIES LTD. Tokyo, Japão.), foi realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm até a base e, a seguir, o tecido mole foi divulsionado e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes. Cada animal recebeu dois implantes, um em cada metáfise tibial, sendo um de cada uma das superfícies avaliadas.

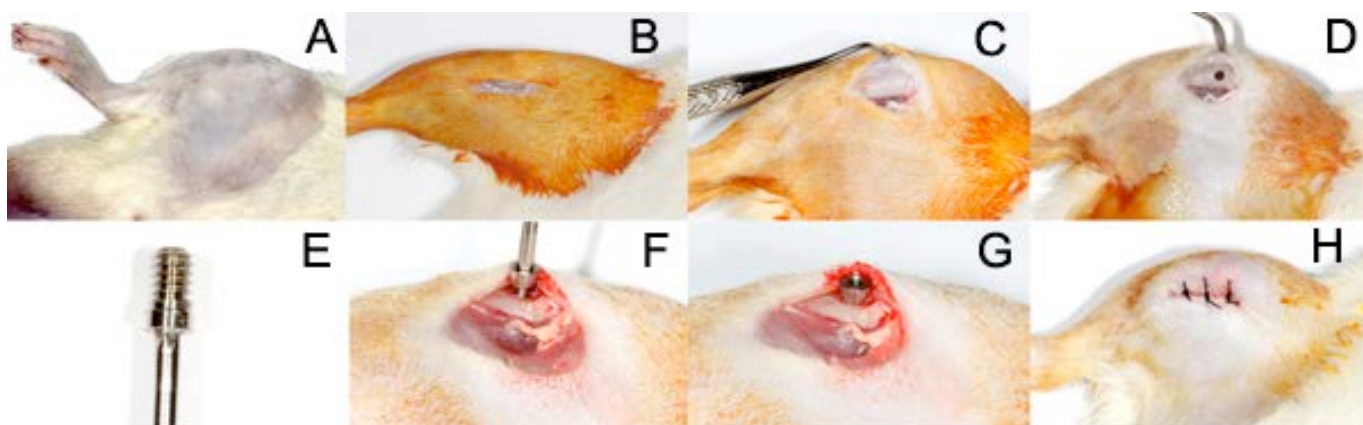
Para a instalação de implantes foi utilizado um motor elétrico com bomba peristáltica (Osseocare®- NOBELBIOCARE®), e um contra-ângulo redutor 16:1(KAVO, SC, Brasil), seguindo a sequência operatória sugerida pelo fabricante dos implantes utilizados.

Foram instalados 360 implantes, sendo 180 com superfície maquinada (Conexao, SP, Brasil) e 180 com superfície tratada com fluoretos (Conexão, SP, Brasil), de 4 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro. O preparo desta última superfície é realizado por meio de ataque ácido ( $H_2SO_4 + HCl + HNO_3$ ) seguido da imersão do implante em solução contendo íons  $Na^+$  e  $F^-$ .

Os tecidos foram suturados empregando-se fio de seda (Seda®-Ethilon 4.0, ETHICON, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos. A figura 1 ilustra a sequência operatória utilizada durante a instalação dos implantes.

Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante a primeira semana de pós-operatório e em seguida, mantidos em caixas de polipropileno até o sacrifício.

Figura 1 - Sequência operatória: A- Tricotomia da tíbia; B- Incisão; C- Descolamento e exposição do tecido ósseo; D- Preparo do leito; E- Implante de superfície maquinada; F- Colocação do implante; G- Implante em posição; H- Sutura.



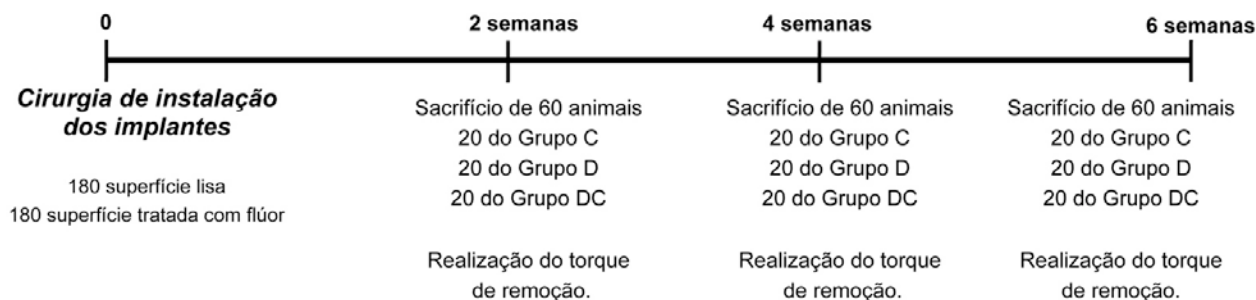
#### Medicação Pós-operatória

Com finalidade de reduzir o risco de infecção pós-operatória e dor, os animais receberam injeções (IM) do antibiótico multibiótico (0.1ml/kg - Multibiótico®, Indústria Farmacêutica Vitalfarma Ltda, MG, Brasil) no pós-operatório imediato e de analgésico (0.1ml/kg- Dipirona Ibase 50%, Laboratório Ibase LTDA, RS, Brasil).

#### Sacrifício

Os animais foram sacrificados com uma dose letal da mesma combinação anestésica utilizada no momento da cirurgia, nos períodos de 2, 4 e 6 semanas após a cirurgia, como ilustrado no esquema a seguir:





Dos 180 implantes de cada superfície que foram avaliados, 90 foram utilizados para análise biomecânica (torque de remoção) e os outros 90 implantes foram utilizados na avaliação histométrica.

#### Análise histométrica

Para esta análise, foram obtidas peças contendo um implante de cada superfície para cada grupo em cada período de avaliação. As tíbias foram removidas e os implantes e tecidos duros circundantes seccionados em blocos e colocados em formalina neutra tamponada a 4%. Após o processo de fixação (48 horas) e posterior lavagem em água corrente, os espécimes foram desidratados em solução de álcool etílico. A infiltração de resina foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC) e álcool etílico, em concentrações crescentes de resina, sendo incluídos em resina e polimerizados.

Os blocos foram montados em lâmina acrílica com o auxílio da resina Tecnovit 4000 (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Utilizando um sistema de corte e microdesgaste (Exact-Cutting, System, Apparatebau GmbH, Hamburgo, Alemanha), as lâminas foram processadas para que tivessem uma secção de aproximadamente 50 a 70  $\mu\text{m}$  de espessura. As peças foram coradas com stevenel's blue + fucsina ácida para análise histométrica.

Para a avaliação do padrão de osseointegração foram realizadas medidas da extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (BIC) e fração de área de tecido ósseo entre as roscas (BAFO). As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, por meio do qual as imagens foram capturadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony electronics Inc, Japão). A determinação dos valores foi feita utilizando um software analisador de imagens (Image tool). Os valores BIC e BAFO foram obtidos em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente.

#### Teste Biomecânico

O teste biomecânico foi realizado por meio do torque de remoção. Para tal, após o sacrifício dos animais, a plataforma dos implantes foi exposta e adaptada ao seu conector protético, para que o torquímetro digital (TQ-680, Instrutherm, Brasil) pudesse ser acoplado. Com o auxílio deste torquímetro foi realizado um movimento anti-horário até que o pico máximo de torque necessário para o rompimento da interface osso/implante fosse obtido e registrado para cada implante removido.

#### Análise Estatística

Os resultados numéricos obtidos do torque de remoção, peso, glicemia, BIC e BAFO foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados estavam distribuídos de acordo com o teorema da distribuição central. Como os dados se distribuíram de forma normal ( $p > 0.05$ ) testes paramétricos foram utilizados para a análise estatística. Para a análise intra-grupos o teste t-pareado foi utilizado para a avaliação dos dados de glicemia e peso, e teste t-não pareado para torque de remoção,

BIC e BAFO. Na comparação intergrupos nos diferentes períodos o teste Anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## **ANEXO**



\* Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (Proc. CEUA número 10/2011)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 10/2011


Araraquara, 26 de agosto de 2013.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado ***"MODULAÇÃO DO REPARO DO TECIDO ÓSSEO PELO DIABETES E INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTAIS EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO"*** (Proc. CEUA nº 10/2011), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração da metodologia e prorrogação no prazo da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **JANEIRO/2015**.

Atenciosamente.

  
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI  
Coordenador da CEUA

Ao  
**Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO**  
DD. Pesquisador Responsável  
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 27 de Setembro de 2013.

LUCAS AMARAL FONTANARI